

R  
008.8  
0827  
88

中山醫學院醫學研究所碩士論文

Master Thesis, Institute of Medicine,

Chung Shan Medical and Dental College

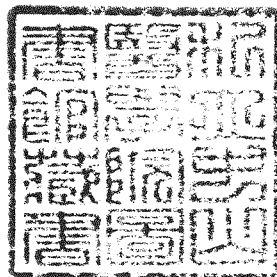
指導教授：林瑞生 (Ruey-Hseng, Lin) 教授

一氧化氮供給劑及內毒素對 RAW 264.7 巨噬細胞之

細胞-遺傳毒性的研究

Studies on the cytogenotoxicities of nitric oxide donors

and endotoxin in RAW 264.7 macrophages.



研究生：許仲岳

中華民國八十八年六月

參考書恕不外借

中山醫學院圖書館



C055174

# 授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 醫學研究所 丙組 87 學年度第 2 學期  
取得 碩士 學位之論文。

論文名稱：一氧化氮供給劑及內毒素對 RAW 264.7 巨噬細胞之細胞-遺傳毒性的研究。

同意     不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利的附件之一，請將全文資料延後兩年後再公開。(請註明文號: \_\_\_\_\_)

-----  
同意     不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名: 林瑞生

研究生簽名: 許仲岳  
(親筆正楷)

學號: R86129  
(務必填寫)

日期: 民國 88 年 6 月 23 日

1. 本授權書請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。
2. 授權第一項者，請再交論文一本予畢業學校承辦人員或逕寄 106-36 台北市和平東路二段 106 號 1702 室 國科會科學技術資料中心 王淑貞。(本授權書諮詢電話: 02-27377746)
3. 本授權書於民國 85 年 4 月 10 日送請內政部著作權委員會 (現為經濟部智慧財產局) 修正定稿。
4. 本案依據教育部國家圖書館 85.4.19 台(85)圖編字第 712 號函辦理。

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院醫學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

台中榮民總醫院教學研究部

王繼平 教授

中國醫藥學院藥物化學研究所

王繼平

---

中山醫學院生理學科

黃純健 副教授

黃純健

---

中山醫學院藥理學科

林瑞生 教授

(論文指導教授)

林瑞生

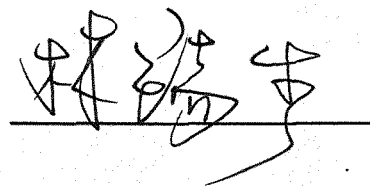
---

中華民國八十八年六月

學生許仲岳論文題目為一氧化氮供給劑及內毒素對 RAW 264.7 巨噬細胞之細胞-遺傳毒性的研究，其論文已經中山醫學院醫學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：林瑞生 教授

簽名：

Handwritten signature of Lin Ruisheng in black ink, written over a horizontal line.

中華民國八十八年六月廿三日

## 誌

## 謝

兩年的研究生生涯已告一個段落，回首來時路，心中不免有一些感謝的話要說。兩年來，在專題討論、實驗和論文寫作上皆受到林瑞生老師的費心指導與修改，令學生心中不勝感激，更覺老師之於學術教學的熱誠與無怨無悔。亦感謝王繼平老師與黃純健老師對本論文的指正及建議，令學生獲益良多，而對本研究有更深一層面的思考方式。

當然，作實驗的過程之中，會經歷很多困難，多半是和林老師討論，或參考期刊之相關 paper，再加上本身的興趣與毅力，才足以克服解決。而在學期間，承蒙惠敏學姊熱心的教導 cell culture 技術，和麟鑫大方的提供 MTT assay 實驗技巧，皆令我印象深刻，亦感謝實驗室的伙伴寶珍及美瑩，或直接或間接對本論文的完成都有或多或少的幫助，在此一併致上最大的謝意。

又是另一個“兩年”的結束，能在退伍後重回學校就讀，是一個難得的學習機會，我非常珍惜它。另外，之所以能無後顧之憂的進入研究所就讀，且全心投入於兩年研究生涯當中，十分感謝父母及家人的關心，支持與鼓勵，回首前塵來時路，一路行來，或許時而步履蹣跚，或許時而激昂興奮，期間的酸甜苦辣，亦感謝麗環的傾聽與支持，使我感覺窩心能面對困境而不退縮。



## 縮寫表 (Abbreviation)

- iNOS : Inducible nitric oxide synthase
- LPS : Lipopolysaccharide
- SNP : Sodium nitroprusside
- GSNO : S-nitrosoglutathione
- SIN-1: 3-morpholinonydnonimine
- SNAP : S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine
- NO : Nitric oxide
- $\text{NO}^-$  : Nitroxyl anion
- $\text{NO}^+$  : Nitrosonium
- $\text{ONOO}^-$  : Peroxynitrite
- $\text{O}_2^-$  : Superoxide
- $\text{NO}_x$  :  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$
- L-NAME :  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginine methyl ester

## 目 錄

中文摘要 (Chinese Abstract) - - - - -	3
英文摘要 (English Abstract) - - - - -	6
緒論 (Introduction) - - - - -	10
NO donors , LPS 及相關藥物 - - - - -	10
Macrophage - - - - -	18
Nitric oxide - - - - -	20
Micronuclei - - - - -	29
MTT assay- - - - -	31
細胞凋亡(Apoptosis)- - - - -	32
材料和方法 (Materials and Methods) - - - - -	35
結果 (Results) - - - - -	46
討論 (Discussion) - - - - -	57
圖表 (Figures and Tables) - - - - -	69
參考文獻 (References) - - - - -	96

## 中文摘要 (Chinese Abstract)

近年來隨著工商業發達，人們生活水準也隨之提高，但車輛數量與工廠密度偏高，導致長期空氣品質不佳，容易影響到人類的健康。例如空氣污染物之一的  $\text{NO}_x$  (氮氧化物) 被呼吸進入人體肺的深部，可引起支氣管炎或肺氣腫，也會增加呼吸道阻力及氣喘發作比例。另外，在大氣中的  $\text{N}_2\text{O}$  氧化變成硝酸，是造成酸雨的原因之一。

由於 NO 對免疫系統的細胞毒性及遺傳毒性很少被研究，所以本研究以 RAW 264.7 macrophages 為實驗標本，加入四種不同的 NO donors，3-morpholinonylnitrosamine (SIN-1)，S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP)，S-nitrosoglutathione (GSNO)，和 sodium nitroprusside (SNP)，或 lipopolysaccharide (LPS) 來探討外生性 NO 和內生性 NO 對 RAW 264.7 macrophages 的細胞-遺傳毒性之影響，及觀察對細胞形態的改變。實驗方法包括有：微小核法 (遺傳毒性的指標)，細胞核分裂係數 (NDI) 法，MTT 分析法 (細胞毒性的指標)，亞硝酸鹽 (Nitrite) 測量法，CPP32 測量法 -- 等方法。並進一步以自由基捕捉劑 (Catalase 和 Superoxide dismutase) 和 Cytarabine (Ara - C) 研究 NO 造成遺傳毒性之機轉，是否和自由基 (ROS) 或 DNA 修復系統 (DNA repair enzyme system) 有關？另外，也以 Lewis lung carcinoma (LLC) 為實驗標本，探討 SNP



是否和 adriamycin 一樣可經由細胞凋亡 (apoptosis) 方式毒殺 LLC 癌細胞？

實驗結果顯示 RAW 264.7 macrophages 經四種 NO donors (外生性 NO) 處理後，均具統計意義地增加微小核頻率和降低細胞存活率，四種 NO donors 在加藥 12 小時所產生之遺傳毒性最強，亦均會降低 RAW 264.7 macrophages 之 NDI 值，同時可測到培養液中 nitrite 的釋放具統計意義地增加。這些結果顯示外生性 NO donors 可經由 NO 產生細胞-遺傳毒性。此外，SOD 和 Catalase 會降低 SNP，SIN-1 和 SNAP 之遺傳毒性，卻不影響 GSNO，暗示 SNP，SIN-1 和 SNAP 增加微小核頻率的機轉，可能和 superoxide，hydrogen peroxide 有關，而 GSNO 可能和 superoxide，hydrogen peroxide 無關，但尚需進一步的研究。四種 NO donors 分別和 Ara - C 相加並不會進一步增加微小核頻率，暗示 NO donors 不是經由 excision - repairable DNA lesions 增加微小核頻率。另外，SNP，SIN-1 和 SNAP 分別與 Ara-C 相加，亦不增加細胞毒性，但 GSNO 具統計意義地對抗 Ara - C 對 RAW 264.7 macrophages 的細胞毒性，可能和 GSNO 可解離釋出 GSH 有某種程度上的關連。

而在 RAW 264.7 macrophages 給與 LPS 的實驗中，觀察到 0.3 和 1  $\mu$ g/ml LPS 有統計意義的增加微小核，而 LPS 處理 2 小時所產生之

遺傳毒性最強。LPS 需在  $30\ \mu\text{g/ml}$  之高濃度才具統計意義的降低細胞存活率，而 LPS 之細胞毒性可分別被 SOD, Catalase 或 L-NAME 有統計意義的降低。LPS 亦具統計意義的增加 nitrite 之釋放，此作用亦顯著的被 L - NAME 降低，顯示 LPS 經由 iNOS 途徑產生 NO。根據這些結果可推論 LPS 的細胞毒性和內生性 NO, superoxide 和 hydrogen peroxide 有關。此外，SNP 和 LPS 均會明顯改變細胞形態。

為更進一步證實 NO 有抗癌的作用，所以使用 SNP 和 ADM 研究其在 LLC 的細胞毒性：SNP 和 ADM 皆具統計意義的降低 LLC 之細胞存活率。SNP 和 ADM 均會增加 CPP32 的活性，此增加活性之作用會被 CPP32 抑制劑 (DEVD-CHO) 所降低，所以 SNP 和 ADM 均以細胞凋亡方式殺死 LLC 癌細胞。結論是四種 NO donors 均能增加 RAW 264.7 macrophages 之微小核頻率，降低其存活率和核分裂係數，又同時均增加  $\text{NO}_2^-$  之形成，所以此四種 NO donors 對 RAW 264.7 macrophages 均透過 NO 而產生細胞-遺傳毒性。由於其遺傳毒性不被 Ara-C 所加強，但被自由基捕捉劑 (Catalase 和 Superoxide dismutase) 所減弱 (GSNO 例外)，所以其造成遺傳毒性之機轉和 excision-repairable DNA lesion 無關，而是經由含氧自由基 (ROS) 造成 DNA 之斷裂或影響紡錘體功能而增加微小核頻率。LPS 在 RAW 264.7 macrophages 造成細胞-遺傳毒性亦至少部分和 NO 之生成有關。

## 英文摘要 (English Abstract)

There are limited data on NO-induced cytogenotoxicity in immune cells. In the present study, micronucleus assay, nuclear division index (NDI), MTT assay and cell morphology were assayed to evaluate cytogenetic toxicities of different NO donors, 3-morpholinopyrrolidine (SIN-1), S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP), S-nitrosoglutathione (GSNO), and sodium nitroprusside (SNP), or lipopolysaccharide (LPS) in RAW 264.7 macrophages. On the other hand, NO release was determined spectrophotometrically by measuring the accumulation of nitrite in the culture medium. In order to approach the mechanisms of NO-induced genotoxicity, the genotoxic interactions of NO donors with cytarabine (Ara-C) or free radical scavengers (Catalase and Superoxide dismutase) were conducted in RAW 264.7 macrophages; the cytotoxic interactions of LPS with L-NAME, Catalase and Superoxide dismutase were also studied. We also assayed CPP32 activity of Lewis lung carcinoma (LLC) to clarify SNP-induced apoptosis in LLC as positive control, adriamycin.

In the present study, all of four NO donors (exogenous NO) significantly increased MN frequency and decreased both cell viability in RAW 264.7 macrophages and NDI. At the same time, all of the four NO donors increased Nitrite concentration in cultured medium in a concentration-dependent manner. In addition, the just incubation time of NO donors-induced genotoxicity in RAW 264.7 macrophages was 12 hr. These results indicated that NO donors induced cytogenotoxicity RAW 264.7 macrophages via NO pathway. The data of genotoxic interactions showed that both SOD and Catalase attenuated the genotoxic effects of SNP, SIN-1 and SNAP, but did not affect GSNO-induced genotoxicity. We suggested that the mechanism of increased MN frequency of SNP, SIN-1 and SNAP may involve with superoxide and hydrogen peroxide generation, but GSNO-induced genotoxicity might be not with ROS, it needs to be further study. All of the four NO donors co-culture with Ara-C did not further increase MN frequency, suggested that NO donors did not cause excision – repairable DNA lesions. Ara-C also did not affect the cytotoxicity of SNP, SIN-1 and SNAP. However, GSNO significantly

decreased the cytotoxicity of Ara-C in RAW 264.7 macrophages, it might be related to GSH was dissociated from GSNO.

LPS at concentrations of 0.3 and 0.1  $\mu\text{g/ml}$  LPS significantly increased MN frequency in RAW 264.7 macrophages, and the just culture time of LPS-induced genotoxicity was 2hrs. However, LPS only at high concentration of 30  $\mu\text{g/ml}$  significantly decreased cell viability. In addition SOD, Catalase or L-NAME significantly decreased LPS-induced cytotoxicity, respectively. LPS also significantly increased nitrite concentration in medium, this effect of LPS was markedly decreased by L-NAME, which suggested that LPS produced NO through iNOS pathway. According to these results, we suggested that LPS-induced involved with generation endogenous NO, superoxide and hydrogen peroxide. In the present study, we observed SNP and LPS markedly changed the morphology of RAW 264.7 macrophages.

In order to further confirm the antitumor effect of NO, the cytotoxic effect of SNP and ADM in LLC was conducted using MTT assay. Both SNP and ADM significantly decreased viability of LLC. In addition, both SNP and ADM increased CPP32 activity, and this

effect decreased by CPP32 inhibitor (DEVD-CHO). It appears that SNP induced apoptosis of LLC as ADM.

In conclusion, we have shown that all of the four NO donors significantly increased MN frequency, decreased cell viability and NDI, even SNP changed cell morphology of RAW 264.7 macrophages. All of four NO donors also increased of nitrite concentration in medium at the same time. Accordingly, all of four NO donors induced cytogenotoxicities via NO formation pathway in raw 264.7 macrophages. However, NO donors-induced genotoxicity did not potentiate by Ara-C, but attenuated (except GSNO) by free radical scavengers (Catalase and SOD). It appears that the mechanism of NO donors-induced genotoxicity did not involve with excision-repairable DNA lesion, they induced genotoxicity via production of oxygen free radicals. In addition, LPS induced cytogenotoxicities in RAW 264.7 macrophages, which is, at least in part, due to NO and oxygen free radicals generation.

## 緒論 (Introduction)

### 一. NO donors, LPS 及相關藥物。

近年來隨著工商業發達，人們生活水準也隨之提高，但車輛數量與工廠密度偏高，導致長期空氣品質不佳，容易影響到人類的健康。例如空氣污染物之一： $\text{NO}_x$  (氮氧化物) 被呼吸進入人體肺的深部，可引起支氣管炎或肺氣腫，也會增加呼吸道阻力及氣喘發作比例。另外，在大氣中的  $\text{NO}_x$  氧化變成硝酸，是造成酸雨的原因之一。

由於 NO 對免疫系統的細胞毒性及遺傳毒性很少被研究，所以本研究以 RAW 264.7 macrophages 為實驗 model，加入四種不同的 NO donors 或 LPS 來探討外生性 NO 和內生性 NO 對 RAW 264.7 macrophages 的細胞毒性或遺傳毒性之影響，由於此四種 NO donors 皆會釋放 NO，但結構式皆不同，SNAP 和 GSNO 皆含 S-NO 基團。另外，SNP 在光線存在下才能釋放 NO。既然此四種 NO donors 之物性，化性有所差異，所以吾人選用此四種 NO donors 探討其在細胞-遺傳毒性之差異性。以下就四種 NO donors 及相關藥物之研究簡介如下：

#### 1. Sodium nitroprusside (SNP)

SNP 的分子量為 261.91，粉末是紅棕色，可溶於水，在溶液中會遇光分解釋放 NO (Bates et al., 1991)。結構式含有一個亞鐵離子中心，和 5 個 cyanide 分子及一個 nitrosyl ( $\text{NO}^-$ ) 基團形成化合物，

分類上屬於 Inorganic iron complex。自 1928 年，人們就已經知道此藥為一種有效的抗高血壓藥物，但直到 1955 年其藥效才被確定。本品是強力的抗高血壓藥之一，因作用期短，所以局限於治療緊急性高血壓。和其他血管鬆弛劑不同處，在於它對於靜脈及動脈兩者血管壁皆有鬆弛作用。SNP 之降血壓功能是其於血管內皮細胞可產生 nitric oxide，然後活化血管平滑肌之 guanylyl cyclase 而增加細胞內 cGMP 濃度，進而舒張血管。SNP 可經由肝臟代謝，產生 thiocyanate。由於 thiocyanate 是由腎臟排除，因此腎臟功能不良的病人須小心 thiocyanate 因不易排洩，造成積蓄在體內而中毒。臨床上常用來治療高血壓危急，充血性心衰竭，心肌梗塞。

SNP 對細胞或組織毒性之相關研究如下：

Ioannidis and Groot (1993) 將 5mM SNP 和 Fu5 rat hepatoma cells 一起培養 8 小時，會降低細胞內 LDH 活性，導致細胞傷害。Volk et al. (1995) 將 Sinusoidal rat liver 內皮細胞分別和 5mM, 10mM 和 20mM SNP 一起培養 6 小時，測量 lactate dehydrogenase (LDH) 活性，皆呈現時間-依賴性增加細胞毒性。Niknahad and O'Brien (1996) 將 rat hepatocytes 和 2mM SNP 一起培養 2 小時，測量 trypan blue uptake，顯著的增加細胞毒性。Blackburn et al. (1998) 將 human glioma cell line 和 0.1-1mM SNP 一起培養 48 小時，以 clonogenic survival



assay，呈現濃度-依賴性降低存活率。Nakazawa et al. (1997) 將 NG108-15 cells 和 10-100  $\mu$ M SNP 一起培養 24 小時，會造成 LDH 釋放和 DNA 斷裂。

## 2. 3-morpholinopyrrolidine (SIN-1)

SIN-1 的分子量為 206.63，可溶於水 (>10mg/ml)，需避光儲存，可作為 NO 的來源。SIN-1 在水溶液可分解成 NO 和  $O_2^-$  (Feelisch et al., 1989)，因而造成 Peroxynitrite 的形成 (Feelisch, 1991)，容易傷害細胞。可見光比避光處理較能促進 SIN-1 釋放 NO (Ullrich et al., 1997)。結構式含有 morpholine 基團，分類上屬於 Sydnones。

SIN-1 對細胞或組織毒性之相關研究如下：

Ishii et al. (1999) 將牛主動脈內皮細胞和 250-1000  $\mu$ M SIN-1 一起培養 24 小時後，會呈現濃度-依賴性的增加 LDH 釋放，導致細胞死亡。Ioannidis and Groot, (1993) 將 rat Fu5 hepatoma cells 分別和 2mM、5mM SIN-1 一起培養 8 小時，皆會降低細胞內的 LDH 活性，導致細胞傷害。Gow et al. (1998) 以牛肺動脈內皮細胞或牛上皮細胞各自曝露 SIN-1 18 小時和 8 小時，皆會劑量-依賴性降低細胞存活率。Gergel et al. (1995) 加入 1mM SIN-1 和 3mM SIN-1 處理 human hepatoma cell line (HepG2) 0 - 24 小時，以 MTT assay，發現均會時間依賴性的降低細胞存活率。Ostrowski et al. (1992) 加

入高濃度 (500  $\mu$ M) 的 SIN-1 和 RAW 264.7 macrophages 一起培養 4 小時，並未發現 NO 會負回饋調節 NOS 的功能。Volk et al. (1995) 給予 Sinusoidal rat liver 內皮細胞與 1mM、2mM 和 5mM SIN-1 一起培養 6 小時，測量 LDH 活性，皆呈現時間-依賴性增加細胞毒性。Nishio et al. (1996) 給予白兔主動脈平滑肌細胞 100  $\mu$ M SIN-1 0-12 小時，分析 DNA ladder 情形，則呈現時間-依賴性增加 apoptosis。

### 3. S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP)

SNAP 的分子量為 220.2，可溶於 DMSO (57.5mg/ml) 或水 (2.1mg/ml)。是一種強的血管擴張劑，in vivo 給藥時會釋放 NO。結構式中含有 S - NO 基團和 acetylpenicillamine，分類上屬於 S-nitrosothiols。

SNAP 對細胞或組織毒性之相關研究如下：

Ioannidis and Groot. (1993) 將 1mM SNAP 和 Fu5 rat hepatoma cells 一起培養 8 小時，會降低細胞內的 LDH 活性，導致細胞傷害。Gergel et al. (1995) 將 human hepatoma cell line HepG2 細胞和 1mM SNAP 或 3mM SNAP 一起培養 24 小時，以 MTT assay，發現均會降低細胞存活率。Volk et al. (1995) 將 sinusoidal rat liver 內皮細胞和 1mM、2mM、5mM SNAP 一起培養 6 小時，測量 LDH 活性，皆呈現時間-依賴性增加細胞毒性。Nakazawa et al. (1997) 將 NG108-15

cells 和  $100\ \mu\text{M}$  SNAP 一起培養 24 小時，會造成 LDH 釋放增加的細胞毒性。Hirano. (1998) 將 SV40T2 cells (type II epithelial cell line) 和  $500\ \mu\text{M}$  SNAP 一起培養 24 小時，以 MTT assay，其存活率下降且 DNA 有斷裂的現象。Nishio et al. (1996) 給予白兔主動脈平滑肌細胞  $10\text{-}100\ \mu\text{M}$  SNAP 24 小時，分析 DNA ladder，呈現劑量-依賴性增加 apoptosis。Dobashi et al. (1997) 將 rat C6 glial cells 和  $50\text{-}100\ \mu\text{M}$  SNAP 一起培養 24 小時，其細胞體內抗氧化酵素 (catalase,  $\text{GP}_x$  和 Mn-SOD) 會降低。Moellering et al. (1999) 將  $0\text{-}500\ \mu\text{M}$  SNAP 和牛主動脈內皮細胞一起培養 12 小時，會劑量-依賴性的增加 GSH。

#### 4. S-nitrosoglutathione (GSNO)

GSNO 的分子量為 336.3，可溶於水，作為 NO 的來源。結構式中含有 S - NO 基團和 glutathione，分類上屬於 S-nitrosothiols。

GSNO 對細胞或組織毒性之相關研究如下：

Delaney et al. (1997) 將 HIT-T15 cells 和  $0\text{-}1000\ \mu\text{M}$  GSNO 一起培養 24 小時，使用 [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation 和 Comet assay，GSNO 會呈劑量-依賴性抑制 DNA 合成和 DNA 傷害。Saker et al. (1995) 給予 canine 靜脈內皮細胞  $100\ \mu\text{M}$  GSNO 48 小時，會抑制細胞的增生能力。Memβmer et al. (1995) 將 RAW 264.7 macrophages 和  $1\text{mM}$  GSNO

一起培養 0-25 小時，分析其 DNA ladder，會呈現時間-依賴性的增加 apoptosis。Andonegui et al. (1999) 在 neutrophils 中給予 100  $\mu$ M GSNO 一起培養 18 小時，以螢光顯微鏡和 flow cytometry，發現有細胞凋亡的現象。

## 5. Lipopolysaccharide (LPS)

Pfeiffer 和 Centanni (1892) 所發現並命名為 endotoxin，Boivin (1930) 利用 trichloroacetic acid 技術萃取出，Westphal 和 Luderitz (1940) 純化出 endotoxin 的活性部份 - LPS。LPS 在革蘭氏陰性菌引起敗血症的角色在 1970 年代被證實。Endotoxin 是由 polysaccharide 和脂肪 lipid A 所構成，會刺激 macrophage 產生三類強力 mediators-例如蛋白質 (如 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 -- 等)，含氧自由基和脂質 (如 PGE<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, PAF -- 等)。可能經由三種方式 (Rietschel and Brade, 1992) 產生 mediators：第一. LPS 先和 Lipopolysaccharide - binding protein (LBP) 結合，然後活化 CD14 receptor 使巨噬細胞產生 mediators。第二. CD14 活化後使第二受體 (LPS receptor) 活化。第三. 不經 LBP 或 CD14 receptor 的幫助，LPS 可能直接活化受體。

LPS 對細胞或組織毒性之相關研究如下：

Abate and Schroder. (1998) 將 murine J774.1A macrophages 和

0.001-30  $\mu\text{g/ml}$  LPS 一起培養 24 小時，以 MTT assay，會呈現劑量-依賴性的增加細胞毒性。Hirano. (1998) 將 SV40T2 cells (rat pulmonary type II cell line) 和 0.002-2  $\mu\text{g/ml}$  LPS 一起培養 24 小時，造成劑量-依賴性的增加 DNA 斷裂。Hortelano et al. (1999) 將 mice peritoneal macrophages 與 200ng/ml LPS 和 10U/ml IFN- $\gamma$  一起培養 24 小時，以 Flow cytometric analysis, caspase assay 和 DNA ladder 分析，發現會造成細胞凋亡。Paul et al. (1997) 以 LPS ( $\text{IC}_{50}$ : 0.05  $\pm$  0.03  $\mu\text{g/ml}$ ) 和 murine RAW 264.7 macrophages 一起培養 24 小時，會抑制 DNA 合成。

## 6. Superoxide Dismutase (簡稱 SOD)

首先由美國學者 McCord 和 Fridovich 等人 (1969) 從牛紅血球中發現並成功萃取出，是一種具有抗氧化活性的高分子酵素，以  $\text{O}_2^-$  作為受質進行清除反應，結構有氨基酸的特徵，其輔助因子為金屬離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ )，常以金屬螯合物的形式存在。依金屬離子的不同，可將 SOD 分為 Cu, Zn-SOD, Mn-SOD 和 Fe-SOD 三類。與其他生物酵素比較起來其理化性質包括有較高的熱穩定性，較高的 pH 穩定性，會吸收 280nm 紫外光波長，對氰化物，還原劑敏感——等。

## 7. Adriamycin

此化合物是從 *S. peucetius* 之變種 *caesius* 的培養基獲得的，所

得的橘紅色針狀物可溶於水及醇中。當溶液 pH 值大於 9 時，橘紅色溶液會變成變成藍紫色。ADM 已經成功使用於減緩急性血癌，Wilms 氏瘤，以及小細胞性肺癌一等。與其他藥物的配合療法正在發展中，以治療某些特殊癌症。劑量-限制性中毒包括：骨髓抑制及心臟毒性。Skladanowski and Konopa. (1993) 加入  $0.98 \mu\text{M}$  adriamycin 和 murine HeLa S<sub>3</sub> cells 一起培養 3 小時，分析其 DNA ladder，有細胞凋亡的現象。

Lin et al. (1998) 以體外微小核實驗，指出 SNP 會造成 g12 cell line 遺傳毒性。Gurr et al. (1988) 也以體外微小核實驗，證實 SNP 會造成 CHO-K1 cells 遺傳毒性。另外，Sewerynek et al. (1996) 以體內微小核實驗，指出 LPS 會造成大鼠之骨髓和末梢血液細胞遺傳毒性。NO 對人類毒性和其他動物毒性稍被了解，但仍有許多地方尚待研究。例如 NO donors 或 LPS 對免疫細胞之細胞-遺傳毒性及其機轉，大多數未被研究清楚，所以本研究以 RAW 264.7 macrophages 作為實驗細胞模式，加入不同的 NO donors (SNP, SIN-1, SNAP 和 GSNO) 或 LPS，以 MTT assay 及微小核法，來觀察這些藥物對免疫細胞的細胞毒性和遺傳毒性之影響。再以 NO donors 產生微小核的實驗條件下，加入 Griess reagents 測量 nitrite，探討微小核的生成是否和 NO 有關？並藉由同時加入 NO donors 和 Catalase 及 SOD 來探討造成

細胞毒性和遺傳毒性的機轉是否和自由基有關？另外藉由 NO donors 和 Ara - C 同時加入來探討造成遺傳毒性的機轉是否和 DNA 修復系統有關？且以 NDI 法和 MTT 法探討其細胞毒性。再者，加入 LPS 分別以微小核法和 MTT 法分析其細胞-遺傳毒性。並藉由同時加入 LPS 和 Catalase 及 SOD 來探討造成細胞毒性的機轉是否和自由基有關？且以 LPS 造成細胞毒性的實驗條件下，加入 Griess reagents 測量 nitrite，並探討 L-NAME 是否會減少 NO 的產生？期望本研究結果能將內生性 NO 或外生性 NO 對免疫細胞之細胞-遺傳毒性及其機轉，提供較完整的資料。另外，NO 也具有殺腫瘤細胞的能力，所以本實驗以 SNP 及 ADM 來探討其在 LLC 之細胞毒性，以及是否經由活化 CPP32 活性而造成 LLC 細胞凋亡？

## 二. Macrophage

### 1. 位置與起源

由 1908 年諾貝爾生理學或醫學獎得主 Metchnikoff 於 1882 年觀察海星幼蟲所發現的。在人體中巨噬細胞是由骨髓造血運動中的單核球分化而來，它可分為自由移動和固定位置的兩類巨噬細胞，依其所在位置命名，例如肝臟的 Kupffer cells，肺臟的 Alveolar macrophages，腹腔的 Peritoneal macrophages，腎臟的 mesangial cells 以及腦部的 microglia cells 等等。

## 2. 形態特性

在細胞培養中，血清本身對巨噬細胞是一種刺激因子，它能誘導巨噬細胞分化，表現為：細胞體積增大，細胞形態從接種時的球形變成多形態。用掃描電子顯微鏡觀察，依形態可將激活巨噬細胞分成兩大類：第一大類呈球形或卵圓形，貼壁面積小，稱為球型巨噬細胞。另一類細胞平展鋪開，貼壁面積較大，稱為伸展型巨噬細胞。有人認為球型巨噬細胞為 G2 晚期與 G1 早期及 M 期細胞，而伸展型巨噬細胞為 G1 晚期及 S 期與 G2 早期細胞。伸展型巨噬細胞的多種形態可能與細胞的吞噬與運動有關。巨噬細胞的細胞質含有相當大的高爾基氏體，rER，sER，粒線體，分泌小泡，以及分解小體。活化的巨噬細胞會生成 NO (Hibbs et al., 1988; Marletta et al., 1988; Stuehr et al., 1989)，參與對抗腫瘤細胞 (Stuehr and Nathan, 1989)，病毒，細胞內外微生物 (Hibbs et al., 1988 ; Nathan, 1982) 和其他外來物的細胞毒性作用。另外，Ischiropoulos et al. (1992) 證實活化的 macrophages 會形成 peroxynitrite，而造成細胞傷害。

## 3. 分泌產物及其作用

巨噬細胞具有吞噬作用，抗原處理，釋放細胞激素 -- 等功用。在血液中的半衰期約 2-3 天，會被 LPS，Cytokines 和發炎調節因子所活化 (Adams and Hamilton, 1984) 成為活化的巨噬細胞而分泌很



多媒介物 (intermediates) , 補體成份, 酵素, 自由基, 其分子量小至 17D, 大至 720000D。包括: cytokines, lysozyme, neutral proteases, acid hydrolases, bioactive lipids, ROS - - 等物質 (Nathan et al., 1980; Nathan, 1982; 1987; Sibille and Reynolds, 1990) , 而影響免疫和發炎反應 (Takemura et al., 1984), 具有抗微生物 (Murray et al., 1980), 殺腫瘤作用 (Nathan and Cohn, 1980)。肺臟的 Alveolar macrophages 具有殺菌活性, 發炎活性和調節肺的恆定性 (Holian and Scheule, 1990)。

#### 4. RAW 264.7 macrophages

RAW264.7 來自 BAB/c strain mouse, 屬於 A-MuLV (Abelson murine leukaemia virus) aetiology, 對 ng/ml 劑量的 LPS 有敏感性, 可促其分泌下列物質包括有: tumoricidal factors, cachectin, 55KDa suppressor factor (lymphocyte regulators), plasminogen activator (neutral proteases)。巨噬細胞之功能可用下列方法測試 (Dean et al., 1982): (1) 腹腔內附著 (resident) 細胞之數目, (2) 吞噬能力 (phagocytosis), (3) lysosomal 酵素, (4) 對腫瘤細胞之毒殺作用, (5) 網狀內皮系統捕捉碘-125 標示 triolein 之能力。

### 三. Nitric oxide

#### 1. 一氧化氮在藥理及免疫學上的研究回顧

Murad (1977) 發現 NO 可以活化 guanylate cyclase，此酵素可將 GTP 轉化成 cGMP，而 cGMP 的增加與平滑肌的舒張有關。更進一步提出 nitroprusside 和 nitroglycerin 的血管鬆弛機轉，與 NO 的釋放有關。Furchgott 與 Zawadzki (1980) 發現 ACh 可使先以 NE 收縮後的主動脈產生鬆弛作用，而此種血管擴張作用必須有完整的內皮細胞才能完成，因為內皮細胞會釋放一種 endothelium-derived relaxing factor (EDRF)。Palmer et al. (1987) 與 Ignarro et al. (1987) 進一步證明 EDRF 就是 NO。1992 年 Science 把 NO 選為 The Molecular of the Year (年度風雲分子)。而在免疫學上的發現，Magee 和 Barnes (1956) 發現硝製食品的硝酸根會在體內轉變成硝基化合物的致癌物質。Green et al. (1981) 發現體內的硝酸根來源不只是食物，人拉肚子期間的尿液和注射 endotoxin 的大鼠都會排出大量的硝酸根。Marletta et al. (1988) 和 Hibbs et al. (1988) 不約而同證實經 macrophages 可產生 NO 而發生免疫和發炎反應。Marletta et al. (1988) 發現先天性缺乏 macrophages 的小鼠排泄很少的硝酸根，經 endotoxin 和  $\gamma$ -interferon 處理的巨噬細胞，開始產生硝酸根。從其他實驗發現巨噬細胞產生硝酸根需要 arginine，由此證明巨噬細胞內的一種特殊的酵素，可將 arginine 變成 citrulline 和不穩定的中間產物-NO，再轉變成亞硝酸根及硝酸根。Hibbs et al. (1987) 將

巨噬細胞和腫瘤細胞一起培養，若 medium 缺乏 arginine，巨噬細胞就沒有殺死腫瘤細胞的能力，並發現第一個 NOS 抑制劑-arginine 的甲基衍生物，只要加入此抑制劑，巨噬細胞就無法生成 NO，也沒有殺死腫瘤細胞的能力。

## 2. NO 的基本性質

NO 是一種簡單氣體分子（分子量：30），本身極不穩定，具有很強毒性的氣體自由基（帶有奇數電子），容易通過細胞膜。在生物系統中的 NO 半衰期大約有 4-50 秒（McCall and Vallance, 1992 ; Ignarro, 1989）。NO 的來源有兩種：一種是內生性 NO，另一種是外生性 NO。內生性 NO 是生物體經物理，化學或機械刺激活化的 nitric oxide synthase (NOS)，以 L-arginine 為受質，並在 FAD，FMN，NADPH 等輔因子協助下，生成 L- citrulline 及釋放 NO 而來。外生性 NO 是來自環境中的空氣，食物或使用藥物。在體內 NO 的來源細胞有：神經細胞，血管內皮細胞（Moncada et al., 1988），嗜中性白血球（Wright et al., 1989），巨噬細胞（Stuehr and Marletta, 1985），肥大細胞，平滑肌細胞等等。內生性 NO 已知可與血液中白蛋白，血紅素，GSH，cysteine，tyrosine 結合。NO 是一個重要的生物調節分子，有許多生理作用包括：擴張血管調節血壓（Rees et al., 1989），殺微生物和抗腫瘤活性（Hibbs et al., 1987），傳遞神經

系統 (Bredt and Snyder, 1989) , 免疫系統及血管等細胞信息, 和抑制血小板凝集 (Radomski et al., 1990) 。 NO 量的多寡牽涉到保護或傷害作用。Nitric oxide 有保護作用 (抗氧化, 抑制淋巴球黏著, 對抗 TNF 毒性) , 調節作用 (血管張力, 細胞黏著, 血管滲透性, 神經傳遞 (Bredt and Snyder, 1989) , 支氣管擴張, 抑制血小板黏著 (Radomski et al., 1990) , 免抑系統, 腎功能。過量的 NO 產生有害作用, 包括酵素功能, 引起 DNA 傷害, 引起脂質過氧化, 增加輻射, Alkylating agents, 毒性金屬的敏感性, 排空抗氧化劑。

### 3. NO 的毒性

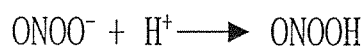
NO 對細胞核的傷害 (Kroncke et al., 1997) 包括有: 造成 DNA 傷害 (例如 G-C → A-T transitions, DNA 股斷裂, p53 的表現, PARP 的活化) 和抑制 DNA 修復酵素。Wink et al. (1991) 發現, 在生理 pH 值下, NO 能造成去氧核酸及完整 DNA 上鹼基的 deamination, 而 nitroglycerin (能釋放 NO 的化合物) 也具有使 *S. typhimurium* TA1535 transition (C-G → T-A) 突變的能力。Nguyen et al. (1992) 證實 NO 也能導致 TK6 cells 單股 DNA 斷裂。Zhang et al. (1994) 指出 NO 會刺激 PARS ; Poly (adenosine 5'-diphosphoribose) synthetase 的 ADP-ribosylation 活化使用導致神經細胞毒性。Isomura et al. (1984) 在體內實驗中, 將鼠肺細胞曝露到高濃度的 NO (27 ppm) 和

NO<sub>2</sub>，都會引起 chromosome aberrations，而造成肺部細胞的突變，證實 NO 和 NO<sub>2</sub> 能引起突變。Arroyo et al. (1992) 使用 *S. typhimurium* TA1535 測試 NO 的突變力時，發現 NO 會隨著曝露時間及劑量的增加，突變比例也隨之增加，但 NO 的毒性可被一些抗氧化劑或自由基捕捉劑如 BHT，β-carotene，α-tocopherol 所抑制。在幾個不同 cell lines (Kroncke et al., 1993; Ionnidis and Groot, 1993; Lipton et al., 1993; Burney et al., 1997) 和其他研究標本中，包括細菌 (Green et al., 1984; Routledge et al., 1993)，哺乳動物細胞 (Routledge et al., 1993; Nguyen et al., 1992; Zhuang and Wogan, 1997) 和 in vivo mouse model (Gal and Wogan, 1996) 一等，NO 已經被證實的確會引起毒性或產生突變。

#### 4. NO 與氧或含氧自由基的反應

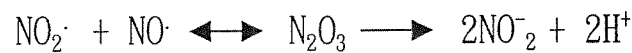
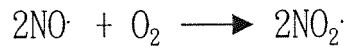
##### (1) 與含氧自由基的反應

在體外實驗中，NO 和 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 會快速反應產生 ONOO<sup>-</sup> 和 OH<sup>·</sup> (Beckman et al., 1990 ; Stamler et al., 1992 ; Huie and Padmaja, 1993)。



##### (2) 與氧的反應：

NO 和氧會反應產生  $\text{NO}_2\cdot$ ，而  $\text{NO}_2\cdot$  會和  $\text{N}_2\text{O}_3$ ， $\text{N}_2\text{O}_4$  保持可逆的平衡 (Marletta et al., 1988)。



## 5. NO 遺傳毒性的可能機轉

有學者指出，NO 的遺傳毒性可能由於使 DNA 的 purine 或 pyrimidine 鹼基 deamination (Wink et al., 1991; Nguyen et al., 1992) 或影響 poly (ADP-ribose) synthetase 的活性所造成 (Zhang et al., 1994)。其機轉可分為直接與間接傷害兩種，敘述如下：

### (1) 直接傷害

NO 的衍生物 ( $\text{NO}_2\cdot$ ， $\text{N}_2\text{O}_3$ ，和  $\text{N}_2\text{O}_4$ ) 會直接造成 DNA 傷害，包括 DNA base deamination，peroxynitrite - DNA 鍵結物的形成和 DNA 單股斷裂。

#### (a) DNA base deamination (Wink et al., 1991; Nguyen et al., 1992)

在生理 pH 值，NO 衍生物 ( $\text{NO}_2\cdot$ ， $\text{N}_2\text{O}_3$ ，和  $\text{N}_2\text{O}_4$ ) 使 DNA deamination，使細菌和哺乳類細胞突變。NO 也可經由 nitrosative deamination 引起 DNA 傷害 (Wink et al., 1991; Nguyen et al., 1992)，而  $\text{NO}_2\cdot$  會引起 DNA 單股斷裂 (Gorsdorf et al., 1990)。

(b) DNA oxidation (Beckman et al., 1990; Tannenbaum et al., 1994)

NO 經一連串的下遊反應會形成 ONOO<sup>-</sup> 和 OH· (Beckman et al., 1990; Tannenbaum et al., 1994) 而引起氧化性 DNA 傷害。Yermilov et al. (1995) 亦指出 peroxynitrite 會使 DNA 之 Guanine base 受硝酸化而造成 DNA 傷害。

## (2) 間接傷害

NO 反應性物種與 amine, thiol 和 lipids 等其他分子交互作用，才間接產生遺傳毒性。

(a) N-nitroso 化合物的形成和活化 (Miwa et al., 1987; Liu et al., 1991; Liu et al., 1992) →alkylate DNA

N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 2 級, 4 級 amines 反應會形成 nitrosamines (屬於 N-nitroso 化合物)。N-nitrosamines 已知是一種化學性致癌劑，會代謝成強親電子性烷基化劑，可以和 DNA 的親核性位置 (guanine 的 N<sup>7</sup> 和 O<sup>6</sup> 位置和 adenine 的 N-3 位置) 反應。在 DNA replication 期間，N-nitrosamines 最常使 O<sup>6</sup>-substitution 和 G → A transitions 而引起突變 (Marnett and Burcham, 1993)。另外，在活化的巨噬細胞培養液中加入 morpholine 也可測到 N-nitroso compounds (Marletta, 1988; Miwa et al., 1987; Iyengar et al., 1987)，此 nitrosation 反應可被維生素 C 和尿酸所抑制 (Kosaka et al., 1989)。

### (b) Nitrosothiol 的形成

氧化性 NO 和含有 sulfhydryl 的 peptide 反應會形成 Nitrosothiols。Nitrosothiols 釋放 NO 的能力和半衰期會被 Transition metals 或 free thiols 所影響。Glutathione (GSH) 是細胞內最重要含 sulfhydryl 的代表，最近已經證明 nitrosoglutathione 和還原型的 GSH 交互作用，會生成有害的  $\text{NH}_3$  釋放 (Singh et al., 1996)。Nitrosothiols 也能和蛋白質的 sulfhydryl 基團反應而改變一些物質的功能，包括有：離子管道 (Lipton et al., 1993 ; Broillet and Firestein, 1996)， $\text{p21}^{\text{ras}}$  (Lander et al., 1995)，phosphotyrosine protein phosphatase (Caselli et al., 1994) 和 cyclooxygenase (Haijar et al., 1995) 等等。GSNO (屬於 Nitrosothiols 的一種) 會造成 epithelial cells (Forrester et al., 1996)，RAW 264.7 macrophages (Messmer et al., 1994 ; Messmer and Brune, 1995)，和 renal mesangial cells 等等細胞，核染色質濃縮，DNA ladder 和 p53 蓄積，而產生細胞凋亡。

### (c) DNA lipid-peroxidation-intermediates

Peroxynitrite 和 DNA，脂質反應而形成 DNA-reactive lipid-peroxidation-intermediates，會引起脂質過氧化 (Radi et al., 1991)。



#### (d) DNA repair enzymes 的抑制

NO 也會抑制一些 DNA 修復酵素的活性 (Laval and Wink, 1994; Wink and Laval, 1994)。在 aerobic 情形之下，NO 會調節 DNA 修復酵素 - Formamidopyrimidine DNA glycosylase (簡稱 Fpg protein) 內鋅手指之 thiol group 受 nitrosation，而不可逆的傷害 DNA 修復酵素 - Fpg protein (Wink and Laval, 1994)。除此之外，NO 也能抑制 O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase (Laval and Wink, 1994)。最近，Graziewicz et al. (1996) 將 NO 和 T4 DNA ligase (在 DNA 複製，修復和重組期間所需要的一種酵素。) 一起培養後，發現 ligase 活性會被抑制，可能和 T4 DNA ligase 之活性位置 lysine residue 被不活化有關。

#### 6. p53 和 NO-driven apoptosis

p53 是腫瘤抑制蛋白，其重要性在於維持基因 integrity，作為基因的 guardian 以監測細胞 DNA 的 state。一般而言，半衰期很短，正常情況下在細胞質中無法測得到或只能測到少量 p53 蛋白質。DNA 傷害後會引起大量的 p53 蛋白質產生，導致細胞停止在 cell cycle 之 check point，而進行 DNA 修復，如 DNA 無法修復則會進行細胞凋亡 (Kastan et al., 1991)。在很多腫瘤細胞生長發現 p53 消失或突變，而高濃度的 NO 也會引起 wild-type p53 蓄積 (Messmer et al.,

1994; Forrester et al., 1996; Ho et al., 1996) 和細胞凋亡 (Messmer et al., 1994; Ho et al., 1996; Fehsel et al., 1995)。NO 已被證實在 RAW 264.7 macrophages 和 RINm5F cells 中經由 p53 造成細胞凋亡 (Messmer et al., 1994; Messmer and Brune, 1996)。另外, Sylvie et al. (1997) 指出 NO 也會使 p53 的功能及結構產生變異, 當 p53 受到傷害時, cell cycle 可能會受到影響, 造成突變細胞增生。

#### 四. Micronuclei

##### 1. 形成原因

遺傳毒性劑, 生理性藥劑, 或致癌劑引起染色體斷裂 (clastogen) 或影響紡錘絲功能 (aneuploidogenes) 常造成微小核 (Matter and Grauwiler, 1974)。微小核是由於細胞在分裂的後期 (Anaphase), 染色體成份因延遲而無法分佈到適當的紡錘體位置, 導致細胞分裂後無法存在子細胞的主核內 (Heddle, 1973)。微小核亦可能由不具著絲點 (kinetochore) 的染色體片段所形成。此外, 含微小核細胞其 p53 量會增加, p53 可使含微小核細胞停留在 G2/M check point, 讓 repair enzyme 修復受損的 DNA, 如 DNA 未能修復, 則進行細胞凋亡 (Schwartz et al., 1997)。另有報告指出抑制 p53 功能會增加微小核頻率 (Salblina et al., 1998)。雖然 Krishna et al. (1995) 認

為微小核與細胞凋亡之間是各自獨立的事件，但上述研究指出二者之間相互關聯，所以尚待更進一步的研究。

## 2. Cytokinesis-block micronucleus (CB - MN) assay

Cytokinesis-block micronucleus (CB - MN) assay (Fenech and Morley, 1985) 是使用 cytochalasin B (Cyt-B; 是一種 actin polymerization 抑制劑) 抑制細胞質分裂 (cytokinesis)，但不阻止細胞核分裂 (karyokinesis) (Carter, 1967)，以便從不分裂細胞 (單核細胞)，第二或多次分裂細胞中 (三核，四核或多核細胞) 區分出第一次有絲分裂 (雙核細胞)。MN 的計數以 1000 個雙核細胞為單位，看其出現頻率。

## 3. 細胞核分裂指標 (Nuclear division index, NDI)

Eastmond and Tucker (1989) 提出 NDI 計算公式： $(1 \times \text{IN} + 2 \times \text{IIN} + 3 \times \text{IIIN} + 4 \times \text{IVN}) / \text{Total cells}$ 。NDI 可指出每個細胞的細胞核平均數，也能偵測細胞毒性或 cell cycle delay。細胞經藥物處理後，經由 CB/MN 法計數單核細胞，雙核細胞及多核細胞出現的頻率，可知其對細胞分裂的影響。

## 4. Ara - C / CB - MN assay

Ara - C 的機轉是經由磷酸化形成 Ara - CTP，和 CTP 競爭性的結合至 DNA 而抑制 DNA polymerase，因而抑制 DNA 合成或修復。對化

學物質或紫外線所造成的鹽基破壞 (base lesion) 或 DNA 鍵結 (DNA adducts)，使用 CB - MN 配合加入 cytosine arabinoside (Ara-C) 抑制 DNA 修補能力 (excision repair) 而造成 MN 頻率增加，來探討藥物造成 MN 的機轉是否和 DNA 修復系統有關 (Fenech and Neville, 1992)。另外，在 human lymphocytes, Ara - C/CB - MN assay 可作為 mitomycin C (MMC), methylnitrosourea (MNU) 造成 MN 是否和 excision repair 有關的新生物指標 (Surralles et al., 1995)。

#### 5. 判斷微小核之準則 (Fenech, 1993):

- (1) 直徑約為主核的 1/3 和 1/16 之間。
- (2) 顯微鏡觀察不呈反射現象。
- (3) MN 必須在細胞質中，不能與主核連接在一起。
- (4) 雙核細胞如含一個以上的 MN 時，以一個 MN 計數。
- (5) 雙核細胞的兩個主核重疊，則不計數。

### 五. MTT assay

本實驗方法於 1983 年首先由 Mosmann 等人發展出，使用 tetrazolium dye, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 來測量淋巴細胞的存活率和增生。其原理是活細胞內的 succinate dehydrogenase 會將黃色 MTT 還原成藍紫色的不溶性 formazan，可作為粒線體活性程度之指標。1990

年 Ferrari 等人使用 macrophages 和 MTT 一起培養 4 小時，再以 570nm ELISA reader，來測量活化的 macrophages 對腫瘤細胞之殺細胞活性 (Ferrari et al., 1990)。如今被廣泛的應用在化學物質之細胞毒性的探討。

## 六. 細胞凋亡 (Apoptosis)

程式性細胞死亡 (Programmed cell death) 或稱細胞凋亡 (apoptosis) 於 1972 年由 Kerr 及 Currie 等人首先提出，是一種由多種遺傳基因導控細胞按步就班死亡的生物現象。當細胞生理或外界因子導致細胞不利生長的狀態時，先會改變細胞內粒線體構造，依破壞程度再執行 necrosis 或 apoptosis。細胞死亡的方式主要有 necrosis 和 apoptosis 兩種，在組織學上有許多顯著的不同 (Cohen, 1993)。Necrosis 主要是因缺氧或毒素引起的，粒線體常是主要的受損目標，機轉為 ATP 用盡而無法維持其滲透性，細胞質膜破壞，產生細胞脹大，DNA，RNA 均被水解，小胞器分解，細胞內容物如 lysosomal enzymes 大量外漏並有炎症反應。而 apoptosis 是個別細胞發生問題，DNA 受損，或已沒有用途，而收到死亡信號，產生 apoptosis，可讓一些分化過程中失敗或對自體可能產生危害的體細胞死亡。其特徵 (Gerschenson and Rotello, 1992) 包括細胞萎縮，染色質凝縮，DNA 受損斷裂被切割成 180-bp oligonucleosomal ladders

(Wyllie, 1980)，細胞膜出現皺縮，細胞分裂成 apoptotic body，會很快被巨噬細胞清除，故無炎症反應。

Apoptosis 在生物個體胚胎發育，組織器官的恆定，發炎及免疫反應的過程扮演相當重要的角色。正常細胞在適當的訊號下能啟動 apoptosis，癌細胞也能，但某些化療藥對特定的癌細胞不產生 apoptosis。由於 NO 可以造成癌細胞的 apoptosis，顯然 NO 在對抗癌細胞中扮演極重要的角色。高濃度 NO 會引起巨噬細胞的 p53 增加，進而活化 caspases 而去切割細胞核蛋白酵素 poly ADP (ribose) polymerase (PARP)，而導致 apoptosis。在一些情況下，低濃度 NO 也會防止 apoptosis，可能和細胞內的抗氧化系統 up-regulation 有關，尤其是 glutathione (Nicotera et al., 1997)。

### 引起 Apoptosis 的酵素 – Caspases: CysteinyI aspartate – specific proteinase 的簡稱 (Alnemri et al., 1996)

Cysteine proteases (蛋白水解酵素) 家族，對許多細胞物質可特異性在其 Asp residues 後加以切割，此種作用在 nematode *C. elegans* 經基因分析後首次被認為和 apoptosis 有關 (Salvesen and Dixit, 1997 ; Nicholson et al., 1997 ; Cohen, 1997)。Caspases 被活化後會激發一連串類似凝血系統的下流反應，最後活化 DN<sub>ase</sub> 將染色體分解而造成細胞凋亡 (Enari et al., 1998)。

Caspases 可分成三個亞型 (Villa et al., 1997) :

(1)interleukin-  $\beta$  -converting enzyme/caspase-1 subfamily

(caspase-1, caspase-4, caspase-5): Ced-3/ICE-like

(2)CPP32/caspase-3 subfamily (caspase-3, caspase-6, caspase-7)

(3)Caspase-2, caspase-8, caspase-9 和 caspase-10

根據個別 caspase 的功能可粗分為: Initiator caspases (負責由細胞膜傳遞 apoptosis 訊息, 如 caspase 8) 和 Effector caspases (負責發動 apoptosis 的中心機轉, 如 caspase 9 及 caspase 3)。

NO 調節 apoptosis 期間, caspase-3 會切割 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) (Me $\beta$ mer et al., 1996)。在 human leukemia cells (Yabuki et al., 1997), mesangial cells (Sandau et al., 1998), 和 neuronal excitotoxicity 中 (Leist et al., 1997) 已經證實 NO donors 會活化 caspases。Me $\beta$ mer et al. (1998) 指出, 1mM GSNO 造成 RAW 264.7 macrophages 和人類 leukaemia cell line U937 apoptosis 和 caspase 有關 (Me $\beta$ mer et al., 1998)。Dimmeler et al. (1997) 亦指出 10  $\mu$ M SNP 或 10  $\mu$ M SNAP 會抑制 TNF- $\alpha$  造成的 apoptosis, 和低濃度 NO 可抑制 CPP32 的活性有關。

## 材料和方法 (Materials and Methods)

### 壹. 實驗材料

#### 一. 藥品試劑

1. 下列產品購自 Gibco 公司:

- (1) Trypsin (0.25%) + 1mM EDTA
- (2) Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS)
- (3) Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)
- (4) Fetal Bovine Serum
- (5) PSN (Antibiotic mixture)

含	5mg	Penicillin
	5mg	Streptomycin
	10mg	Neomycin

2. 下列產品購自 Merck 公司:

- (1) Potassium Chloride (KCl)
- (2) Giemsa
- (3) Fix sol'n (Methanol : Acetic acid = 3:1)
- (4) Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- (5) NaCl
- (6) Sodium nitroprusside (SNP)



(7) Sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ )

3. 下列產品購自 Sigma 公司:

(1) Adriamycin

(2) (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium  
bromide) (MTT)

(3) Cytochalasin B (Cyt B)

(4) Catalase (CA)

(5) Superoxide dismutase (SOD)

(6) Sodium Nitrite

(7) Sulfanilamide (p - Aminobenzenesulfonamide)

(8) N - (1 - naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NEDD)

(9) Phosphoric acid

(10) Cytosine  $\beta$ -D-Arabino-Furanoside (Ara-C)

(11) 2'-Deoxycytidine Hydrochloride

(12) S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP)

(13) S-nitrosoglutathione (GSNO)

(14) 3-Morpholinopyrrolidine (SIN-1)

(15) Lipopolysaccharide (LPS)

(16)  $N_\omega$  - nitro - L - arginine methyl ester (L-NAME)

4. 下列產品購自 CLONTECH 公司：

(1) CPP32 colorimetric assay kits

含	32ml	cell lysis buffer
	1.5ml	2×Reaction buffer
	250 $\mu$ l	DTT (1M)
	125 $\mu$ l	CPP32 substrate, DEVD-pNA (1mM)
	15 $\mu$ l	CPP32 inhibitor, DEVD-CHO (1mM)
	50 $\mu$ l	pNA (50mg/ml)

## 二. 常用緩衝液及培養液之配製

### 1. DMEM

取出 DMEM 粉末，加入 3.7mg  $\text{NaHCO}_3$  溶於 1L 的二次水，pH 值調至 7.2 (Adams, 1979) 後，過濾滅菌。

### 2. D-PBS

取出 D-PBS 粉末加入 1L 二次水，過濾滅菌。

## 三. 細胞

RAW 264.7 macrophages 和 Lewis lung carcinoma (LLC) cells (購自食品工業研究所)

#### 四. 儀器

##### 1. 無菌操作台 (Laminar Flow Biological Safety Cabinet)

- a. 廠牌: Bellco
- b. 型號: 8001 - 74000
- c. 出產地: Canada

##### 2. 培養箱 (Incubator)

- a. 廠牌: Nadair
- b. 型號: IR AUTOFLOW
- c. 出產地: U. S. A.

##### 3. 光學顯微鏡 (Microscope)

- a. 廠牌: Nikon
- d. 型號: Microphot - FAX
- e. 出產地: Japan

##### 4. 電子天平 (Electrical Balance)

- a. 廠牌: Mettler
- b. 型號: AE 240
- c. 出產地: Canada

##### 5. 倒立顯微鏡 (Inverse Microscope)

- a. 廠牌: Nikon

- b. 型號: phase contrast 2 FLWD 0.3
  - c. 出產地: Japan
6. 酸鹼測定儀 (PH meter)
- a. 廠牌: WTW
  - b. 型號: PH 537
  - c. 出產地: Germany
7. 水平式振盪器 (Roating Plateform shaker)
- a. 廠牌: Firstek Scientific
  - b. 型號: S101D
  - c. 出產地: Taiwan
8. 微量光度計 (Microplate Reader)
- a. 廠牌: Metertech
  - b. 型號:  $\Sigma$ 960
  - c. 出產地: Taiwan
9. 分光光度計 (Spectrophotometer)
- a. 廠牌: Gilford
  - b. 型號: 2600
  - c. 出產地: U. S. A.
10. 高壓滅菌器 (Autoclave)

- a. 廠牌: SANYO
- b. 型號: MLS-3020
- c. 出產地: Japan

## 貳. 實驗方法

### 一. 細胞培養 (Adams, 1979)

#### A. 試劑:

1. 含有 10% FCS (Fetal bovine serum) 及 1% PSN (Penicillin, Streptomycin, Neomycin) 的 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)。
2. D-PBS
3. 0.25% Trypsin + 1mM EDTA

#### B. 方法:

RAW 264.7 macrophages 的細胞週期約 18 小時。

↓ 計數  $5 \times 10^5$  個 RAW 264.7 macrophages 置入每個培養皿中。

↓ 培養在含有 10% FCS 及 1% PSN 的 DMEM 中。

↓ 放入含有 5% CO<sub>2</sub> 的 37°C 培養箱。

↓ 培養 24 小時。

↓ 加入或不加入各種不同濃度的藥物作用不同的時間後，採取下列

實驗方法來研究 LPS 或 NO donors 對 RAW 264.7 macrophages 的細胞存活率，微小核，NDI，Nitrite 之形成以及造成微小核的機轉。

## 二. 微小核法 (Fenech and Morley, 1985)

### A. 試劑:

Cytochalasin B (0.5mg/ml)

0.25% Trypsin + 1mM EDTA

KCl (75mM)

Fix sol'n (methanol : acetic acid = 3 : 1)

3% Giemsa

### B. 方法:

↓ 計數  $5 \times 10^5$  個 RAW 264.7 macrophages，滴於 dish 上的玻片，加入 10ml 培養液。

↓ 培養 24 小時。

↓ 加入不同濃度 NO donors 及  $60 \mu\text{l}$  (0.5mg/ml) Cyt-B 作用 12 小時後，抽掉含藥物的培養液，加入新培養液和  $60 \mu\text{l}$  (0.5mg/ml) Cyt-B 繼續培養 12 小時，抽掉培養液。

↓ 加入 75mM KCl 後倒掉，再加入固定液後倒掉，烘乾玻片。

↓ 以 3% Giemsa 染色 7 分鐘後，水洗並烘乾玻片。

↓ 在顯微鏡下連續計數 1000 個雙核細胞所含的 MN 數目，各實驗組  
每次觀察六次，相同實驗組則至少操作二次。

### 三. MTT assay (Sano et al., 1997)

#### A. 試劑:

1. MTT mixture (4mg MTT 溶於 1ml D-PBS): 每個 well 加入 50  $\mu$ l。
2. Dimethyl sulfoxide (DMSO): 每個 well 加入 200  $\mu$ l。

#### B. 方法:

- ↓ 每個 well 置入 5000 個細胞。
- ↓ 放入 37°C，5% CO<sub>2</sub> 的培養箱培養 24 小時。
- ↓ 加入或不加入 NO donors 作用 12 小時。
- ↓ 抽掉含藥的舊培養液，加入新的培養液，繼續培養 12 小時。
- ↓ 抽掉培養液，加入 150  $\mu$ l 的新培養液和 50  $\mu$ l MTT (4mg/ml) 培養 4 小時。
- ↓ 抽掉含 MTT 的培養液，加入 200  $\mu$ l DMSO，以 roating platform shaker 振搖 15 分鐘。
- ↓ 以 ELISA reader 在 570nm 分析 O.D. 值。

### 四. 測量 Nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Sano et al. 1997)

A. 試劑:

1. Griess reagent:

1% (w/v) sulfanilamide 和 0.1% (w/v) N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride (NEDD) 溶於含有 2.5%  $H_3PO_4$  的二次水中。

2.  $NaNO_2$  Standard: 1-100  $\mu M$

B. 方法:

↓ 每個 well 加入 5000 個細胞。

↓ 培養 24 小時。

↓ 加入或不加入不同的藥物作用不同的時間。

↓ 加入 Griess reagent 處理 15 分鐘後，以 ELISA reader 在 570nm 測其 O.D. 值。

↓ 再對照 Sodium nitrite standard curve 即得 nitrite 的濃度。

## 五. CPP32 分析法 (Wang and Keiser, 1998)

A. 試劑:

1. cell lysis buffer: 每管加入 50  $\mu l$ 。

2. 2×Reaction buffer 和 DTT (1M) 的 mixture (用前才配製，配法如下): 2.5  $\mu l$  DTT 加入 0.4ml 2×Reaction buffer 即可，每管加入 50  $\mu l$ 。



3. CPP32 substrate, DEVD-pNA (1mM): 需避光, 每管加入  $5\mu\text{l}$ 。
4. CPP32 inhibitor, DEVD-CHO (1mM): 每管加入  $1\mu\text{l}$ 。

B. 方法:

- ↓ 每個培養皿放入  $4 \times 10^6$  LLC cells。
- ↓ 培養 24 小時。
- ↓ 換新培養液, 分別加入 SNP 或 ADM 作用 12 小時。
- ↓ 清洗細胞, 以新培養液沖管壁使細胞懸浮後, 移到離心管內。
- ↓ 以 1500rpm 離心 5 分鐘。
- ↓ 將細胞分到六個 reaction tubes 中, 每個大約 0.5-1.5ml ( $2 \times 10^6$  cells)。
- ↓ 每管加入  $50\mu\text{l}$  cell lysis buffer, resuspension 後, 冰浴 10 分鐘。

※ 各處理組操作如下:

a. 對照組

- ↓ 對照組加入  $50\mu\text{l}$  reaction mixture (含 DTT) 後, 加入 (負對照組) 或不加入 (空白組)  $5\mu\text{l}$  substrate (DEVD-pNA) 避光。
- ↓ 水浴  $37^\circ\text{C}$ , 作用 1 小時後, 分別以分光光度計在 405nm 測 O. D. 值。

b. 加藥組

b - 1. 加 CPP32 inhibitor

↓ 先加  $1\ \mu\text{l}$  CPP32 inhibitor (DEVD - CHO) 再加  $50\ \mu\text{l}$   $2\times$  reaction mixture (含 DTT) 水浴  $37^\circ\text{C}$  作用 30 分鐘。

↓ 加入  $5\ \mu\text{l}$  substrate (DEVD-pNA) 避光， $37^\circ\text{C}$  水浴 1 小時後，以分光光度計在 405nm 測 O.D 值。

b - 2. 不加 CPP32 inhibitor

↓ 加  $50\ \mu\text{l}$   $2\times$  reaction mixture (含 DTT) 再加  $5\ \mu\text{l}$  substrate (DEVD - pNA) 避光， $37^\circ\text{C}$  水浴 1 小時後，以分光光度計在 405nm 測 O.D. 值。

### 參. 統計分析

實驗結果以 Mean  $\pm$  S. E. 表示，實驗組別相互之間以 Student's t-Test 評估，當  $p < 0.05$  時，則具有統計意義。

## 結果 (Results)

### 一. 亞硝酸的生成 (Nitrite production)

#### 1. NO donors 對 RAW 264.7 macrophages 生成 Nitrite 之影響:

將含有不同濃度之四種 NO donors (SIN-1, SNAP, GSNO, 和 SNP) 和 RAW 264.7 macrophages 一起培養 12 小時後, 加入 Griess reagents 測培養液中 nitrite 含量。所誘導之 nitrite 的濃度 ( $\mu\text{M}$ ) 如下: 10, 30, 60 和 100  $\mu\text{M}$  的 SIN-1 所誘導之 nitrite 分別為  $0.48 \pm 0.8$ ,  $5.26 \pm 0.6$ ,  $10.26 \pm 0.7$ , 和  $21.66 \pm 0.9$ ; 10, 30, 60, 和 100  $\mu\text{M}$  SNAP 所誘導之 nitrite 分別為  $0.35 \pm 0.8$ ,  $4.13 \pm 0.8$ ,  $13.8 \pm 1.0$ , 和  $23.52 \pm 1.0$ ; 10, 30, 60, 和 100  $\mu\text{M}$  GSNO 所誘導之 nitrite 分別為  $0.10 \pm 0.6$ ,  $1.63 \pm 0.7$ ,  $5.91 \pm 0.7$ , 和  $12.49 \pm 1.1$ ; 10, 30, 60, 和 100  $\mu\text{M}$  SNP 所誘導之 nitrite 分別為  $0.28 \pm 0.8$ ,  $0.72 \pm 0.9$ ,  $1.52 \pm 0.9$ , 和  $3 \pm 0.7$ 。與 control ( $0.03 \pm 0.5$ ) 比起來, 皆有統計意義且呈現濃度-依賴性的增加 nitrite 生成 (Table 1), 換言說, 給予 RAW 264.7 macrophages 四種不同外加性 NO donors (10-100  $\mu\text{M}$ ) 培養 12 小時後, 均呈現濃度-依賴性的顯著增加 NO, 但 SNP 較不易釋放 NO。

#### 2. L-NAME 對 LPS 引起 RAW 264.7 macrophages 生成 Nitrite 之影響:

將 RAW 264.7 macrophages 和  $30 \mu\text{g/ml}$  LPS 一起培養 24 小時後，測培養液之 nitrite 含量 ( $\mu\text{M}$ )，和 control 比起來 ( $\text{NO}_2^-$ :  $0.13 \pm 0.16$ )， $30 \mu\text{g/ml}$  LPS 會顯著的增加 Nitrite ( $\text{NO}_2^-$ :  $3.93 \pm 0.14$ )，而此作用可被  $200 \mu\text{M}$  L-NAME 顯著的抑制 ( $\text{NO}_2^-$ :  $0.90 \pm 0.16$ )。(Fig. 1)。

## 二. 細胞毒性 (Cytotoxicity)

### 1. NO donors 或 LPS 對 RAW 264.7 macrophages 細胞毒性之影響:

給予 RAW 264.7 macrophages 四種不同濃度的 NO donors 作用 12 小時後，以 MTT assay 測其細胞存活率，以 O.D. 值分別表示如下： $30 \mu\text{M} - 1\text{mM}$  SIN-1 為  $0.97 \pm 0.02 - 0.31 \pm 0.01$ ； $30 \mu\text{M} - 1\text{mM}$  SNAP 為  $0.88 \pm 0.03 - 0.52 \pm 0.02$ ； $10 \mu\text{M} - 100 \mu\text{M}$  GSNO 為  $0.79 \pm 0.04 - 0.67 \pm 0.02$ ；和  $30 \mu\text{M} - 1\text{mM}$  SNP 為  $1.14 \pm 0.04 - 0.59 \pm 0.01$ ，與對照組 (O.D. 分別如下： $1.11 \pm 0.02$ ， $1.49 \pm 0.04$ ， $1.28 \pm 0.06$ ，和  $1.46 \pm 0.05$ ) 相比，發現各種濃度之 NO donors 均具統計意義增加細胞毒性 (Fig. 2, 3, 4, 5)。另外，給予 RAW 264.7 macrophages 不同濃度的 LPS ( $1, 10, 20, 30 \mu\text{g/ml}$ ) 2 小時，以 MTT assay 測其存活率，只有高濃度之  $30 \mu\text{g/ml}$  LPS (O.D.:  $0.89 \pm 0.04$ ) 會顯著的增加細胞毒性，而  $1-20 \mu\text{g/ml}$  不影響 macrophages 之細胞會降低其細胞存活率 (Fig. 6)。

### 三. 遺傳毒性 (Genotoxicity)

#### 1. NO donors 對 RAW 264.7 macrophages 產生微小核之影響:

將含有不同濃度之四種 NO donors (SIN-1, SNAP, GSNO, 和 SNP) 和 RAW 264.7 macrophages 一起培養 12 小時後, 以微小核數目作為遺傳毒性的指標, 10, 30, 60 和 100  $\mu$ M SIN-1, 所誘導之微小核數目分別為  $14.3 \pm 0.5$ ,  $16.0 \pm 0.7$ ,  $11.2 \pm 0.6$  和  $8.2 \pm 0.6$ 。10, 30, 60 和 100  $\mu$ M SNAP, 所誘導之微小核數目分別為  $15.4 \pm 0.4$ ,  $15.3 \pm 0.9$ ,  $14.5 \pm 0.6$  和  $8.3 \pm 0.4$ 。3, 10, 30, 60 和 100  $\mu$ M GSNO, 所誘導之微小核數目分別為  $11.2 \pm 1.0$ ,  $17.8 \pm 1.1$ ,  $15.3 \pm 0.8$ ,  $9.0 \pm 0.8$  和  $9.2 \pm 1.1$ 。1, 3, 10, 20, 30, 60 和 100  $\mu$ M 的 SNP, 所誘導之微小核數目分別為  $10.8 \pm 0.3$ ,  $14.0 \pm 0.6$ ,  $14.8 \pm 0.3$ ,  $15.3 \pm 0.5$ ,  $18.8 \pm 0.6$ ,  $16.8 \pm 0.5$  和  $8.4 \pm 0.4$ 。與 control ( $7.2 \pm 0.5$ ) 比起來, 只有 10-30  $\mu$ M SIN-1, 10-60  $\mu$ M SNAP, 10-30  $\mu$ M GSNO, 和 3-60  $\mu$ M SNP 具統計意義的增加微小核生成 (Table 2)。

四種 NO donors, SIN-1 (10-30  $\mu$ M), SNAP (10-60  $\mu$ M), GSNO (10-30  $\mu$ M), 和 SNP (3-60  $\mu$ M), 給予 RAW 264.7 macrophages 作用 12 小時後, 和正對照組之 0.3  $\mu$ M Adriamycin (微小核數目:  $15.0 \pm 0.6$ ) 一樣具統計意義的造成遺傳毒性 (Table 2)。

另外，以四種不同的 NO donors 做 time course (6, 12, 18, 24 小時) 之探討，SIN-1 (微小核數目:  $16.8 \pm 1.0$ )，SNAP (微小核數目:  $17.0 \pm 0.4$ )，GSNO (微小核數目:  $15.0 \pm 0.7$ ) 和 SNP (微小核數目:  $20.0 \pm 0.7$ ) 在 12 小時會呈現統計意義的增加微小核頻率。而 SNAP (微小核數目:  $18.0 \pm 0.8$ ) 在 18 小時也有統計意義的增加微小核頻率 (Fig. 7)。結果顯示欲觀察 NO donors 在 macrophages 之遺傳毒性以培養 12 小時較適當。

## 2. LPS 對 RAW 264.7 macrophages 產生微小核之影響:

將 LPS ( $0.1 - 3 \mu\text{g/ml}$ ) 和此細胞一起培養 2 小時，觀察其對微小核之影響 (微小核數目:  $14.6 \pm 0.88 - 17.08 \pm 0.48$ )，與 control (微小核數目:  $7.6 \pm 0.46$ ) 相比，可具統計意義的增加微小核數目 (Fig. 8)。另外，以  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS 作 time course (2, 4, 8, 12 小時) 的探討，發現此濃度的 LPS 作用 2 和 4 小時 (微小核數目分別為  $17.7 \pm 0.76$  和  $11.3 \pm 0.72$ ) 才會統計意義的增加微小核 (Fig. 9)，而 8 小時和 12 小時的處理組，可能 LPS 造成有遺傳毒性之 macrophages 死亡，所以反而不增加微小核的數目。

## 四. 細胞核分裂指標 (NDI)

SIN-1, SNAP, GSNO 和 SNP 對 RAW 264.7 macrophages 的 NDI 之影響:

如 Table 3 之數據所示，將含有不同濃度的 NO donors (SIN-1, SNAP, GSNO, 和 SNP) 和 RAW 264.7 macrophages 一起培養 12 小時後，實驗結果顯示其 NDI 分別如下：10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 60  $\mu$ M 和 100  $\mu$ M 的 SIN-1 組其 NDI 分別為 1.72  $\pm$  0.02, 1.65  $\pm$  0.03, 1.63  $\pm$  0.01 和 1.62  $\pm$  0.02；10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 60  $\mu$ M 和 100  $\mu$ M 的 SNAP 組其 NDI 分別為 1.85  $\pm$  0.02, 1.68  $\pm$  0.02, 1.55  $\pm$  0.03 和 1.49  $\pm$  0.07；3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M 和 60  $\mu$ M 的 GSNO 組其 NDI 分別為 1.78  $\pm$  0.05, 1.62  $\pm$  0.01, 1.57  $\pm$  0.04 和 1.55  $\pm$  0.04；10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 60  $\mu$ M 和 100  $\mu$ M 的 SNP 組其 NDI 分別為 1.73  $\pm$  0.04, 1.70  $\pm$  0.02, 1.69  $\pm$  0.02 和 1.67  $\pm$  0.02，分別和 control (1.77  $\pm$  0.03) 比起來，SIN-1, SNAP 和 SNP (大於 30  $\mu$ M 以上)，以及 GSNO (大於 10  $\mu$ M 以上) 均具有統計意義的抑制 NDI 和降低雙核細胞的數目 (Table 3)。

## 五. NO donors 或 LPS 和拮抗劑在細胞-遺傳毒性之交互作用。

### 1. SOD 或 Catalase 與 NO donors 或 LPS 之交互作用：

#### a. 細胞毒性之交互作用

如 Fig. 10 和 Fig. 11 所示，100  $\mu$ M 的 SIN-1, SNAP, GSNO, SNP 分別加入 RAW 264.7 macrophages 培養 24 小時後，各組別之 O.D. 值

分別為：100  $\mu$ M SIN-1 (O.D. : 0.8054  $\pm$  0.0977)，100  $\mu$ M SNAP (O.D. : 0.7656  $\pm$  0.0288)，100  $\mu$ M GSNO (O.D. : 0.7406  $\pm$  0.0169)，和 100  $\mu$ M SNP (O.D. : 0.7841  $\pm$  0.0558)，和對照組 (O.D. : 1.2433  $\pm$  0.0289) 相比，均有統計意義的增加細胞毒性。而 75  $\mu$ g/ml Catalase (O.D. : 1.1301  $\pm$  0.0484) 或 75  $\mu$ g/ml SOD (O.D. : 1.1596  $\pm$  0.0173) alone 不具細胞毒性，若同時和 NO donors 一起作用，發現 Catalase 和 SOD 均具統計意義的降低 SIN-1 (Catalase + SIN-1 的 O.D. : 1.1451  $\pm$  0.0359 ; SOD + SIN-1 的 O.D. : 1.1975  $\pm$  0.0226)，SNAP (Catalase + SNAP 的 O.D. : 0.8961  $\pm$  0.0354 ; SOD + SNAP 的 O.D. : 0.7656  $\pm$  0.0288)，和 SNP (Catalase + SNP 的 O.D. : 0.91  $\pm$  0.0618 ; SOD + SNP 的 O.D. : 1.0440  $\pm$  0.0363) 的細胞毒性，卻無法對抗 GSNO (Catalase + GSNO 的 O.D. : 0.7154  $\pm$  0.0394 ; SOD + GSNO 的 O.D. : 0.7406  $\pm$  0.0169) 的細胞毒性 (Fig. 10 和 11)。另外，為了探討 LPS 引起 RAW 264.7 macrophages 之細胞毒性的機轉，分別給予 200  $\mu$ M L-NAME (O.D. : 1.5811  $\pm$  0.0671)，75  $\mu$ g/ml SOD (O.D. : 1.7147  $\pm$  0.04726)，75  $\mu$ g/ml Catalase (O.D. : 1.7934  $\pm$  0.0236) 和 30  $\mu$ g/ml LPS 一起培養 24 小時後，和 control (O.D. : 1.8613  $\pm$  0.0696) 比較，L-NAME (L-NAME + LPS 的 O.D. : 1.5274  $\pm$  0.0566)，SOD (SOD + LPS 的 O.D. : 1.4241  $\pm$  0.0394) 和 Catalase (Catalase + LPS 的



O.D. :  $1.3457 \pm 0.0332$ ) 皆會降低 LPS (O.D. :  $1.116 \pm 0.0631$ ) 引起的細胞毒性 (Fig. 12)。

#### b. 遺傳毒性之交互作用

如 Fig. 13 和 Fig. 14 所示,  $30 \mu\text{M SIN-1}$ ,  $30 \mu\text{M SNAP}$ ,  $10 \mu\text{M GSNO}$ , 和  $30 \mu\text{M SNP}$  加入 RAW 264.7 macrophages 培養 12 小時後, 各組別之微小核數目分別為:  $30 \mu\text{M SIN-1}$  (微小核數目分別為  $17.0 \pm 0.4$  和  $17.0 \pm 0.4$ ),  $30 \mu\text{M SNAP}$  (微小核數目分別為  $16 \pm 0.5$  和  $16.0 \pm 0.5$ ),  $10 \mu\text{M GSNO}$  (微小核數目分別為  $15.3 \pm 0.4$  和  $15.8 \pm 0.4$ ),  $30 \mu\text{M SNP}$  (微小核數目分別為  $19 \pm 0.3$  和  $18 \pm 0.3$ ), 和 control (微小核數目分別為  $7.2 \pm 0.3$  和  $7.5 \pm 0.3$ ) 比較, 均有統計意義的增加微小核頻率。而  $75 \mu\text{g/ml catalase}$  (微小核數目為  $8.2 \pm 0.9$ ) 或  $75 \mu\text{g/ml SOD}$  (微小核數目為  $8.2 \pm 0.9$ ) alone 則不會增加微小核的頻率, 若和 NO donors 一起作用, 會降低 SIN-1 (SIN-1 + catalase 之微小核數目為  $8.2 \pm 0.5$ ; SIN-1 + SOD 之微小核數目為  $8.0 \pm 0.4$ ), SNAP (SNAP + Catalase 之微小核數目為  $8.3 \pm 1.0$ ; SNAP + SOD 之微小核數目為  $8.7 \pm 0.6$ ), SNP (SNP + Catalase 之微小核數目為  $7.8 \pm 0.6$ ; SNP + SOD 之微小核數目為  $8.2 \pm 0.6$ ) 產生的微小核頻率, 但不會降低 GSNO (GSNO + Catalase 之微小核數目為  $15.5 \pm 0.4$ ; GSNO + SOD 之微小核數目

為  $16.0 \pm 0.6$ ) 產生的微小核頻率 (Fig. 13 和 14)。

## 2. Ara-C 與 NO donors 引起 RAW 264.7 macrophages 細胞毒性與遺傳毒性之交互作用：

### a. 細胞毒性之交互作用

NO donors 分別加入 RAW 264.7 macrophages 培養 12 小時後， $30 \mu\text{M}$  SIN-1 (O.D. :  $0.9416 \pm 0.0266$ )， $30 \mu\text{M}$  SNAP (O.D. :  $0.9831 \pm 0.0312$ )， $10 \mu\text{M}$  GSNO (O.D. :  $1.1783 \pm 0.0285$ )，和  $30 \mu\text{M}$  SNP (O.D. :  $0.9198 \pm 0.0525$ )，各自和 control (O.D. 分別為  $1.1783 \pm 0.0285$  和  $1.18 \pm 0.0567$ ) 比較，均有統計意義的造成細胞毒性，而  $1 \mu\text{g/ml}$  Ara-C (O.D. 分別為  $0.6291 \pm 0.0323$  和  $0.6173 \pm 0.0231$ ) alone 也會增加細胞毒性。當 SIN-1，SNAP，SNP 各自和 Ara-C 一起作用時 (SIN-1 + Ara-C 的 O.D. 為  $0.606 \pm 0.0161$ ；SNAP + Ara-C 的 O.D. 為  $0.6253 \pm 0.0203$ ；SNP + Ara-C 的 O.D. 為  $0.669 \pm 0.0343$ )，和 NO donors 或 Ara-C 單獨存在下比較起來，Ara-C 和此三種 NO donors 互不加強細胞毒性 (Fig. 15 和 16)。與 Ara-C (O.D. :  $0.6291 \pm 0.0323$ ) alone 比較起來，GSNO 和 Ara-C 一起作用時 (GSNO + Ara-C 的 O.D. 為  $0.8383 \pm 0.0404$ )，GSNO 會降低 Ara-C 造成的細胞毒性 (Fig. 16)。

## b. 遺傳毒性之交互作用

NO donors 分別加入 RAW 264.7 macrophages 培養 12 小時後，30  $\mu$ M SIN-1 (微小核數目:  $15.0 \pm 0.6$ )，30  $\mu$ M SNAP (微小核數目:  $16.0 \pm 0.8$ )，10  $\mu$ M GSNO (微小核數目:  $17.0 \pm 0.5$ )，和 30  $\mu$ M SNP (微小核數目:  $20.0 \pm 0.8$ )，與 control (微小核數目:  $7.1 \pm 0.6$ ) 比較，均有統計意義的增加微小核頻率，而 1  $\mu$ g/ml Ara-C (微小核數目:  $16.0 \pm 1.5$ ) 單獨存在時也會增加微小核頻率。當 SIN-1，SNAP，GSNO，SNP，各自和 Ara-C 一起培養 12 小時後 (SIN-1 + Ara-C 的微小核數目為  $14.5 \pm 0.7$ ；SNAP + Ara-C 的微小核數目為  $14.0 \pm 0.8$ ；GSNO + Ara-C 的微小核數目為  $15.0 \pm 0.5$ ；SNP + Ara-C 的微小核數目為  $17.0 \pm 1.0$ )，和此四種 NO donors 單獨存在下比較起來，Ara-C 並不會增加此四種 NO donors 的微小核的頻率 (Fig. 17)。

## 六. SNP 和 adriamycin 對 LLC 之細胞毒性的影響

在 LLC 中分別投與 SNP 或 ADM 作用 12 小時後，和 control (O.D.:  $0.7338 \pm 0.0332$ ) 比較，1-3  $\mu$ M 的 ADM (O.D.:  $0.5517 \pm 0.05$ ，O.D.:  $0.5130 \pm 0.0400$ ) 均有意義的殺死 LLC 細胞，200-500  $\mu$ M 的 SNP (O.D.:  $0.5422 \pm 0.0346$ ，O.D.:  $0.2729 \pm 0.0219$ ，O.D.:  $0.0969 \pm 0.0111$ ) 則呈現劑量-依賴性增加細胞毒性 (Fig. 18)。

## 七. CPP32 assay

為了進一步探討 SNP 及 adriamycin 造成癌細胞的細胞毒性，是否和 CPP32 (引起 apoptosis 的酵素之一) 有關？所以在 LLC 中分別投與 300  $\mu$ M SNP 或 3  $\mu$ M ADM 作用 12 小時，並使用 CPP32 colorimetric assay kit 及 spectrophotometer 分析，實驗結果顯示：SNP 及 ADM 會增加 CPP32 的活性，以 control 之 O.D. 值當 100%，SNP 及 adriamycin 分別增加 CPP32 活性為 207.7% 和 198.1%。而此作用會被 DEVD-CHO (CPP32 inhibitor) 所抑制，活性分別降為 165.8% 和 125.2% (Fig. 19)。

## 八. 細胞形態

### 1. 微小核。

如 Fig. 20 所示，含微小核之雙核細胞，微小核位於細胞質中，比主核小但不與主核連接。

### 2. 對照組之 RAW 264.7 macrophages。

如 Fig. 21 所示，為正常之 RAW 264.7 macrophages 之型態，細胞多呈球形或卵圓形，有少數伸開偽足的細胞。

### 3. 加入 1mM SIN-1 作用 12 小時之 RAW 264.7 macrophages。

如 Fig. 22 所示，卵圓形細胞數目減少，含有較多的偽足細胞，且偽足形態呈現不規則形。

### 4. 加入 100 $\mu$ M SNAP 作用 12 小時之 RAW 264.7 macrophages。

如 Fig. 23 所示，除了卵圓形的細胞，也含有伸開偽足的細胞。  
和 Fig. 21 比起來，變化不大。

5. 加入 100  $\mu$ M GSNO 作用 12 小時之 RAW 264.7 macrophages。

如 Fig. 24 所示，除了卵圓形的細胞之外，也有伸開偽足的細胞。  
和 Fig. 21 比起來，並無很大變化。

6. 加入 1mM SNP 作用 12 小時之 RAW 264.7 macrophages。

如 Fig. 25 所示，幾乎不具有伸出偽足的細胞，大多數細胞呈現  
圓形，明亮的細胞減少。由 Fig. 26 可以看出，整個細胞體積變小  
被破壞分解，顏色變暗，可能是即將死亡或已死亡的細胞。

7. 加入 30  $\mu$ g/ml LPS 作用 12 小時之 RAW 264.7 macrophages。

以 Fig. 27 和 Fig. 21 比起來，除了含有少數卵圓形的細胞，也  
含有很多伸出偽足且細胞體積有變大發炎的現象。如 Fig. 28 所示，  
含有較多伸出偽足的細胞，呈現不規則形且有細胞體積變大發炎的  
現象，細胞質可看到許多空泡。

## 討論 (Discussion)

### 1. LPS 和 NO donors 對 RAW 264.7 macrophages 生成 $\text{NO}_2^-$ 之影響。

以 LPS 處理後的老鼠 macrophage cell lines 會生成  $\text{NO}_2^-$  和  $\text{NO}_3^-$  (Stuehr and Marletta, 1987), 若給予  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS 處理 0-48 小時, 然後呈現時間-依賴性的增加, 6 小時後才能偵測到  $\text{NO}_2^-$  (Habib et al., 1997 ; Hall et al., 1994 ; Chiou et al., 1998), 48 小時到達最高 (Hall et al., 1994), 然後呈現時間-依賴性的增加。但本研究則觀察到  $30 \mu\text{g/ml}$  LPS 處理 24 小時可引起 RAW 264.7 macrophages 釋放 NO 而產生  $\text{NO}_2^-$ , 會被  $200 \mu\text{M}$  L-NAME 顯著的對抗。相似的報告被其他學者所提出 (Brockhaus and Brune, 1999), 他們指出  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS +  $10 \text{ i. u. /ml}$  IFN- $\gamma$  引起 RAW 264.7 macrophages 釋放  $\text{NO}_2^-$  的作用, 會被  $1\text{mM}$  L-NAME 所對抗。Sano et al. (1997) 以  $100 \mu\text{M}$  SNAP 處理 RAW 264.7 macrophages 0 - 24 小時, 會呈現時間-依賴性的增加  $\text{NO}_2^-$ 。本實驗亦觀察到以  $10-100 \mu\text{M}$  NO donors (GSNO, SIN-1, SNAP 和 SNP) 處理 RAW 264.7 macrophages 12 小時後, 皆呈現劑量-依賴性的增加  $\text{NO}_2^-$ 。其中以 SNP 釋放  $\text{NO}_2^-$  之量最少。一般而言, NO donors 釋放 NO 之作用受光線之影響, SNP 在沒有光線存在之下不會釋放 NO (Bates et al., 1991), 而 SIN-1 在光存在之下, 釋放 nitrite 的量比黑暗中較

多 (Ullurich et al., 1997)，此可能和 NO donors 之化學結構不同有關。RAW 264.7 macrophages 加入四種 NO donors 後 12 小時大部分時間在黑暗之二氧化碳培養箱中培養，所以 SNP 釋放較少 NO 是可理解的。

## 2. NO donors 或 LPS 對 RAW 264.7 macrophages 的細胞毒性之影響。

本研究以 RAW 264.7 macrophages 曝露不同濃度的 NO donors (30  $\mu$ M-1mM SIN-1, 30  $\mu$ M-1mM SNAP, 30  $\mu$ M-1mM SNP 和 10  $\mu$ M-100  $\mu$ M GSNO) 12 小時後，皆呈現統計意義的降低細胞存活率。相似的報告被 Sano et al. (1997) 所提出，其以 100  $\mu$ M SNAP 處理 RAW 264.7 macrophages 0-24 小時，使用 MTT assay，發現 SNAP 會呈現時間-依賴性的降低細胞存活率。Moro et al. (1998) 將 0.02-5mM SIN-1 和 rat cortical neurones 一起培養 24 小時，使用 MTT assay，也呈現劑量-依賴性降低細胞存活率。另外，Abate and Schroder (1998) 以 0.001-30  $\mu$ g/ml LPS 處理 J774.1A macrophages 24 小時，使用 MTT assay，觀察到 LPS 會以劑量-依賴性的方式降低細胞存活率。而本研究以 1-30  $\mu$ g/ml LPS 處理 RAW 264.7 macrophages 2 小時，只有 30  $\mu$ g/ml LPS 具有統計意義的降低細胞存活率，此可能因只以 LPS 處理 2 小時，較低濃度之 LPS 尚未

造成細胞毒性。

### 3. NO donors 或 LPS 對 RAW 264.7 macrophages 的遺傳毒性之影響。

Das et al. (1994) 指出蚊香被吸入老鼠體內，其肺 alveolar macrophages 會生成染色體異常和增加微小核，所以 Sahu and Das (1995) 建議使用肺的 alveolar macrophages 之微小核分析法，可作為一種實驗模式來偵測環境毒劑經由呼吸道進入體內的遺傳毒性。Gurr et al. (1998) 觀察到在 CHO - K1 cells 中，給予 0.25-1mM SNP 培養 4 小時，呈現劑量-依賴性的增加微小核頻率。Lin et al. (1998) 也看到在 g12 cells 中給予 2-8  $\mu\text{mol/ml}$  SNP 培養 1 小時，會呈現劑量-依賴性的增加微小核頻率，而在 S9 存在下，同時給予 0.5-4  $\mu\text{mol/ml}$  SNP 培養 1 小時，也有同樣的情形。本實驗以不同濃度的 NO donors 和 RAW 264.7 macrophages 一起培養 12 小時後，觀察到 10-30  $\mu\text{M}$  SIN-1，10-60  $\mu\text{M}$  SNAP，10-30  $\mu\text{M}$  GSNO 和 3-60  $\mu\text{M}$  SNP，皆有統計意義的增加微小核頻率，其中 SNP 和其他學者報告相似 (Lin et al., 1998)，呈劑量-依賴性的增加遺傳毒性，但其他 NO donors 就無此現象，可能 SNP 除產生 NO 外，尚可經由其他機轉造成遺傳毒性。另外，四種 NO donors 均以 30  $\mu\text{M}$  作 time course (6-24 小時) 的探討，SIN-1，



SNAP, GSNO 和 SNP 處理 12 小時，另外 SNAP 處理 18 小時，才有統計意義的增加微小核頻率，這些結果暗示四種 NO donors 均有相同的機轉，如經由 NO 然後直接或間接的造成遺傳毒性。Sewerynek et al. (1996) 發現體內實驗給予 10mg/kg LPS 會對大鼠骨髓和末梢血球細胞產生微小核的遺傳毒性，此能力可被 Melatonin (保護 DNA 對抗 LPS 的毒性) 降低，可能和其抗氧化活性有關。本實驗觀察到以 RAW 264.7 macrophages 曝露 0.3-1  $\mu$ g/ml LPS 2 小時後，具有統計意義的增加微小核頻率。再以 1  $\mu$ g/ml LPS 作 time course (2-12 小時)，只有在 2 和 4 小時才具統計意義的增加微小核頻率。這些數據顯示 NO donors 和 LPS 均需在適當的時間才產生遺傳毒性，加藥時間過久，可能含微小核雙核細胞先死亡，所以測不到遺傳毒性。

#### 4. NO donors 對 RAW 264.7 macrophages 之 NDI 影響

Lin et al. (1998) 觀察到在 g12 cells 中，給予 2-8  $\mu$ mol/ml SNP 培養 1 小時，呈現劑量-依賴性的降低 NDI。此結果和本研究有一致性，本研究以 RAW 264.7 macrophages 和不同濃度的 NO donors 一起培養 12 小時後，觀察到 30-100  $\mu$ M SNAP, 30-100  $\mu$ M SIN-1, 10-60  $\mu$ M GSNO 和 30-100  $\mu$ M SNP 皆具統計意義的抑制 NDI，所以四種 NO donors 均有延遲 RAW 264.7 macrophages 之細胞分

裂的作用，而 SNAP 和 GSNO 抑制細胞分裂之作用似乎較強。

5. SOD, Catalase, 或 Ara - C 分別和 NO donors 在 RAW 264.7 macrophages 之細胞-遺傳毒性的交互作用。

本實驗發現 SOD 和 Catalase 會降低 SNP, SIN-1 和 SNAP 的微小核發生頻率和其細胞毒性，但不會降低 GSNO 的微小核發生頻率及細胞毒性。Delaney et al. (1997) 也觀察到相似的結果， $300 \mu\text{M}$  GSNO 造成 HIT-T15 cells 之 DNA 斷裂，不會被 SOD 或 Catalase 所對抗。所以暗示 SNP, SIN-1 和 SNAP 造成微小核的增加以及細胞毒性可能部分機轉和含氧自由基有關，而 GSNO 和含氧自由基無關，但尚需進一步的研究。關於 NO donors 引起細胞-遺傳毒性的原因有很多，並非只由單一機轉而來，常因細胞和實驗條件的不同而有所不同，但大多數的報告指出和含氧自由基之形成有關，Brown (1995) 指出低濃度的 NO ( $0.18 \mu\text{M}$ ) 能可逆性的抑制 Catalase 而減少對  $\text{H}_2\text{O}_2$  的催化作用。Burney et al. (1997) 指出 NO 引起神經細胞毒性是一個很複雜的過程，可能和 DNA 合成的抑制，粒線體不活化，細胞膜分解，細胞周期停止，DNA 斷裂和 apoptosis 等有關。Beckman et al. (1990) 和 Radi et al. (1991) 指出活化的 neutrophils 和 macrophages 會產生 superoxide，並和 NO 形成  $\text{ONOO}^-$ ， $\text{ONOO}^-$  和  $\text{H}^+$  結合成  $\text{ONOOH}$  然後分解成 OH 自由基和  $\text{NO}_2$  自由基，均較 NO 本身具毒性。而

peroxynitrite 引起神經細胞毒性，可能經由 DNA 傷害和過度活化 poly (ADP-ribose) synthase (PARS) 而造成  $\text{NAD}^+$  和 ATP 排空 (Zhang et al., 1994)，或粒線體傷害 (Bolanos et al., 1995) 而來。Moro et al. (1998) 發現 100U/ml SOD 會加強 500  $\mu\text{M}$  SIN-1 對 rat cortical neurones 造成的細胞死亡，可能和增加  $\text{H}_2\text{O}_2$  形成有關。Hogg et al. (1992 - 3) 觀察到 SIN-1 會生成 NO 和  $\text{O}_2^-$ ，進而形成 peroxynitrite 而造成神經毒性，Lipton et al. (1993) 則認為 SIN-1 造成神經毒性並非單獨經由 NO 本身而來。Ishii et al. (1999) 的實驗認為 1mM SIN-1 造成 endothelial cell death，可能和 NO， $\text{O}_2^-$ ，OH 及  $\text{H}_2\text{O}_2$  有關。Ioannidis and Groot (1993) 以 5mM SIN-1 造成 Fu5 rat hepatoma cells damage，認為可能和  $\text{H}_2\text{O}_2$  有關。Troy et al. (1996) 觀察到在 PC12 cells 中，SIN-1 分解生成的 NO 和  $\text{O}_2^-$  會形成 peroxynitrite 而使 Cu/Zn superoxide dismutase 活性下降而導致細胞死亡。Szabo and Salzman (1995) 觀察到在 J774.2 macrophages 中，內生性 peroxynitrite 可能和抑制粒線體呼吸有關。de-Rojas-Walker et al. (1995) 在 RAW 264.7 macrophages 中，證實內生性 NO 會引起氧化性 DNA 傷害和 DNA deaminations。Brune et al. (1997) 在 RAW 264.7 macrophages，以 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS 和 100 units/ml IFN- $\gamma$  處理 15 小時後觀察到會生成 superoxide 可對抗 GSNO 引起的 apoptosis。另外，

Xia and Zweier (1997) 以 LPS + IFN- $\gamma$  刺激 RAW 264.7 macrophages，發現培養液不加 l-arginine，反而更活化 iNOS 生成 NO 和 superoxide，轉而合成 peroxynitrite，而參與 macrophages 的抑菌或殺菌作用。Paul et al. (1997) 認為 LPS 在 RAW 264.7 macrophages 抑制其 DNA 合成之作用和 NOS 及 NO 的生成無關。Zingarelli et al. (1996) 的實驗經 10  $\mu$ g/ml LPS 處理的 J774.2 macrophages，1 小時內就產生 superoxide，8 小時後時間-相關性增加 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>，和 peroxynitrite anion 的產生及 DNA 的斷裂，細胞存活率亦隨著時間-相關性的降低，學者們認為 peroxynitrite 會造成 DNA 傷害，因而過度活化 PARS 引起細胞能量耗盡而死亡。Sano et al. (1997) 給予 RAW 264.7 macrophages 和 100  $\mu$ M SNAP 一起培養 24 小時，會促進 Mn-SOD 和 Cu/Zn-SOD 的表現，可保護細胞免於遭受 NO 的毒性。Brockhaus and Brune (1999) 給予 RAW 264.7 macrophages 500  $\mu$ M SNAP 培養 8 小時，會促進 CuZn-SOD 的過度表現，可保護細胞免於遭受 NO 的 apoptosis。本實驗觀察到外加 SOD 和 Catalase 會對抗 SNP, SIN-1，SNAP 和 LPS 降低細胞存活率之作用，但不會影響 GSNO 降低細胞存活率，亦觀察到 SOD, Catalase 和 L-NAME 會對抗 LPS 之細胞毒性，由於 NO donors 和 LPS 均會增加 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>的釋出，根據這些結果可推論 SNP, SIN-1, SNAP 和 LPS 造成細胞毒性和 NO, superoxide, hydrogen

peroxide 有關，而 GSNO 造成 RAW 264.7 macrophages 的細胞毒性可能和 superoxide, hydrogen peroxide 較無關，尚需進一步的探討。

Fenech and Neville (1992) 指出在人類淋巴球細胞使用 Ara - C 和細胞質分裂阻斷微小核分析法的混合方法，可進一步偵測突變劑是否產生 DNA excision - repairable lesions ? Fenech et al. (1994) 以 methylnitrosourea, UV light (254nm) 或 hydroxyurea 與 Ara - C 一起處理，會進一步增加微小核頻率，顯示這些突變劑會造成 excision - repairable DNA lesion。本實驗發現 Ara - C 和 NO donors 一起培養 12 小時後，並不會進一步的加強 SNP, SIN-1, SNAP 和 GSNO 的增加微小核頻率的作用，表示 NO donors 之遺傳毒性和 DNA excision - repairable lesions 無關。此外，使用 MTT assay 觀察其在細胞存活率的交互作用。結果發現 Ara - C 和 NO donors 一起培養 12 小時後，不影響 SNP, SIN-1 和 GSNO 之細胞毒性，GSNO 則會對抗 Ara - C 之細胞毒性。Nishikawa et al. (1997) 指出外加 GSH 會降低 NO 抑制粒線體呼吸的作用。Reed (1990) 認為 GSH 是一種重要的自由基清除劑，也可作為細胞最重要抗氧化劑。Lynn et al. (1994) 認為 GSH 可當抗氧化劑，減少 nickel 傷害 DNA repair 酵素。亦有學者認為 Ara - C 造成細胞毒性，可能與自由基有關，其促使細胞內的 GSH 增加 (Hedley and McCulloch, 1996)。綜合這些報告，可能是 GSNO

釋放 NO 後的 GSH，協同細胞體內的 GSH 清除自由基，以致 GSNO 可對抗 Ara - C 的毒性。

#### 6. SNP 在 LLC 之細胞毒性及對 CPP32 活性之影響。

NO 會引起腫瘤細胞的 apoptosis: 包括 rat sarcoma cells (Xie et al., 1995)，L929 cells 和 K-1735 melanoma cells (Xie et al., 1995)。另外，NO 也會使 Swiss 3T3 cells (Khan et al., 1997) 造成 apoptosis。Haendeler et al. (1997) 指出低劑量的 NO 不管以何種氧化還原狀態存在，可經由使 caspase 家族受 S-nitrosylation 而保護細胞免於遭受 apoptosis。Barry et al. (1990) 指出很多不同型態的癌細胞曝露到不同的化療藥時（包括抗代謝，DNA topoisomerase inhibitors，干擾微管劑和烷基化劑），會發生 apoptosis。Azmi et al. (1997) 發現經 0.1  $\mu$ M adriamycin 處理 24 小時後的 rat thymocytes，其 CPP32/apopain 被活化而切割 poly ADP-ribose polymerase，最後造成 DNA 斷裂而引起 apoptosis。Wang and Keiser (1998) 觀察到經 100  $\mu$ M - 1mM SNP 處理 24 小時的兔子血管平滑肌細胞，會呈現劑量-依賴性的增加 apoptosis，此作用和 CPP32 活性被增加有關。Tamatani et al. (1998) 指出 50  $\mu$ M SNP 和 cortex neuron 一起培養 24 小時，導致的細胞存活率下降和 caspase - 3 活化有關。Sumitani et al. (1997) 則觀察到經 1mM SNP 處理 16

小時的 NA cells，產生 apoptosis 可能和 c-myc 的抑制及 c-myb proto-oncogenes 有關。Sweet and David (1996) 以 1-5  $\mu$ g/ml ADM 處理 RAW 264.7 macrophages 24 小時，使用 MTT assay，發現會劑量-依賴性的降低細胞存活率。在本研究以 100  $\mu$ M-1mM SNP 或 1-3  $\mu$ M ADM 和 LLC 一起培養 12 小時後，觀察到 200  $\mu$ M-1mM SNP 呈現劑量-依賴性的降低 LLC 癌細胞存活率，1 和 3  $\mu$ M ADM 亦有統計意義降低 LLC 癌細胞之存活率，由於 ADM 只處理 12 小時，所以細胞毒性不強。Wang and Keiser (1998) 在兔子腎動脈血管平滑肌中，分別加入或不加入 0.1mM，0.5mM，1mM SNP 和 CPP32 抑制劑 (DEVD-CHO) 一起培養 24 小時，觀察到 SNP 會呈現劑量-依賴性的增加 CPP32 活性，此作用會被 DEVD-CHO 所降低，和本研究有相似之結果。而本研究中的 300  $\mu$ M SNP 和 3  $\mu$ M ADM 均能增加 LLC 癌細胞之 CPP32 蛋白酶活性，此增加作用均被 CPP32 抑制劑，DEVD-CHO，所抑制。這些結果顯示，SNP 和 ADM 一樣會以細胞凋亡方式造成 LLC 癌細胞死亡。

#### 7. NO donors 或 LPS 對細胞型態的改變。

Blanco et al.(1995) 分別以 2mmol/L SNP 和 2mmol/L SNAP 加入人類關節軟骨細胞一起培養 16 小時和 8 小時後，使用光學、螢光及電子顯微鏡觀察，可以看到 SNP 和 SNAP 在自由基清除劑存在之下，仍會造成細胞體積變小，細胞膜有 budding 的現象和形成 apoptotic

bodies，所以認為 NO 造成細胞凋亡和含氧自由基無關。Jun et al. (1996) 分別以 2mM SNP 和 5U/ml IFN- $\gamma$  + 10ng/ml LPS 處理 murine macrophages 2 小時和 48 小時，使用光學顯微鏡觀察，分別加入 SNP 或 IFN- $\gamma$  + LPS 均會使 NO 造成細胞骨架之 actin 受 ADP-ribosylation 而改變 macrophages 之細胞形態和功能。Gobbel et al. (1997) 以 0.5mM SNP 加入 rats cerebral 內皮細胞一起培養 18 小時，使用光學顯微鏡觀察，SNP 會破壞此細胞，造成細胞死亡，此作用會被 Catalase 和 SOD 所對抗，認為 NO 和 superoxide 會同時生成並協同加強細胞毒性。Albina and Reichner (1998) 以電子顯微鏡觀察 RAW 264.7 macrophages 經 10U/ml IFN- $\gamma$  + 1 $\mu$ g/ml LPS 處理 48 小時的細胞形態，發現有 apoptotic bodies 和細胞膜 blebs 的生成。Abd-El-Basset and Fedoroff (1995) 認為 10 $\mu$ g/ml LPS 造成 mice microglia 的細胞形態改變可能使其細胞骨架成分 F-actin，intermediate filaments 和 microtubule 的重新組合有關。根據這些結果可推測本研究的 SNP 和 LPS 可經由影響細胞骨架的組合改變細胞形態。由於其他 NO donors 並不影響 macrophages 之細胞形態，所以可能透過 NO 以外的途徑來改變細胞形態。



**結論 (In conclusion):** 1. RAW 264.7 macrophages 經 NO donors 或 LPS 處理後，均會生成 NO，而 LPS 增加 NO 之作用會被 L-NAME 所抑制，這些結果表示 NO donors 會生成外加性 NO，LPS 則促進內生性 NO 產生。2. NO donors 或 LPS 對 RAW 264.7 macrophages 均會造成細胞-遺傳毒性，其中 SNP，SNAP，SIN-1 和 LPS 之細胞-遺傳毒性可被 Catalase 和 SOD 所降低，所以其細胞-遺傳毒性之機轉可能和 NO 經一連串的反應促使 superoxide，hydrogen peroxide 增加所造成，而 GSNO 的細胞-遺傳毒性之機轉可能和 superoxide，hydrogen peroxide 較無關。3. 四種 NO donors 之遺傳毒性，以及 SNP，SIN-1 和 SNAP 之細胞毒性均不被 Ara - C 所加強，顯示四種 NO donors 之遺傳毒性和 excision-repairable DNA lesions 無關。此外，GSNO 會對抗 Ara - C 的細胞毒性，可能 GSNO 會分解釋出 NO 和 GSH，此外外加性 GSH 配合內生性 GSH 減少 Ara - C 之細胞毒性。4. SNP 和 ADM 均能活化 CPP32 蛋白酵素而造成 LLC 癌細胞以細胞凋亡方式死亡。根據這些結果可知 NO donors (GSNO 除外) 和 LPS 可經含氧自由基 (ROS) 而對 RAW 264.7 macrophages 造成細胞-遺傳毒性，SNP 亦可經由活化 CPP32 蛋白酵素，然後可能分解 PARP 而造成 LLC 癌細胞凋亡。然而，NO donors 和 LPS 造成哺乳類之細胞-遺傳的機轉不可能這麼單純，尚待用不同的角度加以探討。

**Table 1**

Nitrite concentration in treatment solution after exposure to various concentrations of different NO donors in RAW 264.7 macrophages for 12hrs.

Treatment	Concentration ( $\mu$ M)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> concentration ( $\mu$ M)
Control	-	0.03 $\pm$ 0.48
SIN-1	10	0.48 $\pm$ 0.78*
	30	5.26 $\pm$ 0.56*
	60	10.26 $\pm$ 0.67*
	100	21.66 $\pm$ 0.89*
SNAP	10	0.35 $\pm$ 0.78*
	30	4.13 $\pm$ 0.78*
	60	13.80 $\pm$ 0.91*
	100	23.52 $\pm$ 0.87*
GSNO	10	0.10 $\pm$ 0.56*
	30	1.63 $\pm$ 0.67*
	60	5.91 $\pm$ 0.67*
	100	12.49 $\pm$ 1.09*
SNP	10	0.28 $\pm$ 0.78*
	30	0.72 $\pm$ 0.89*
	60	1.52 $\pm$ 0.89*
	100	3.00 $\pm$ 0.67*

Data are shown as mean  $\pm$  S.E..

n = 8 from 2-3 replicate culture for each treatment group.

\*P < 0.05 as compared with control.

**Table 2**

Effect of NO donors, SIN-1, SNAP, GSNO, and SNP, on micronucleus induction in RAW 264.7 macrophages.

Treatment	Concentration( $\mu$ M)	Number of micronucleated cells /1000 binucleated cells.
Control	-	7.2 $\pm$ 0.5
SIN-1	10	14.3 $\pm$ 0.5*
	30	16.0 $\pm$ 0.7*
	60	11.2 $\pm$ 0.6
	100	8.2 $\pm$ 0.6
SNAP	10	15.4 $\pm$ 0.4*
	30	15.3 $\pm$ 0.9*
	60	14.5 $\pm$ 0.6*
	100	8.3 $\pm$ 0.4
GSNO	3	11.2 $\pm$ 1.0
	10	17.8 $\pm$ 1.1*
	30	15.3 $\pm$ 0.8*
	60	9.0 $\pm$ 0.8
	100	9.2 $\pm$ 1.1
SNP	1	10.8 $\pm$ 0.3
	3	14.0 $\pm$ 0.6*
	10	14.8 $\pm$ 0.3*
	20	15.3 $\pm$ 0.5*
	30	18.8 $\pm$ 0.6*
	60	16.8 $\pm$ 0.5*
	100	8.4 $\pm$ 0.4
ADM	0.3	15.0 $\pm$ 0.6*

Data are shown as mean  $\pm$  S.E..

n = 4-8 from 2-3 replicate cultures for each treatment group.

\*P < 0.05 as compared with control.

**Table 3**

**Effect of different NO donors on cell cycle kinetics in RAW 264.7 macrophages.**

Treatment	concentration ( $\mu$ M)	cell cycle kinetics (based on 500 cells)			N.D.I.
		1N	2N	3N - 4N	
Control	-	125 $\pm$ 12.9	350 $\pm$ 14.3	23 $\pm$ 2.4	1.77 $\pm$ 0.03
SIN-1	10	148 $\pm$ 7.9	332 $\pm$ 8.8	20 $\pm$ 1.4	1.72 $\pm$ 0.02
	30	195 $\pm$ 13.3	285 $\pm$ 11.5*	20 $\pm$ 2.0	1.65 $\pm$ 0.03*
	60	203 $\pm$ 4.2	280 $\pm$ 2.4*	17 $\pm$ 3.2	1.63 $\pm$ 0.01*
	100	210 $\pm$ 7.2	273 $\pm$ 7.0*	17 $\pm$ 2.0	1.62 $\pm$ 0.02*
Control	-	125 $\pm$ 12.9	350 $\pm$ 14.3	23 $\pm$ 2.4	1.77 $\pm$ 0.03
SNAP	10	113 $\pm$ 5.8	348 $\pm$ 7.6	39 $\pm$ 6.2	1.85 $\pm$ 0.02
	30	184 $\pm$ 8.6	285 $\pm$ 8.0*	27 $\pm$ 3.3	1.68 $\pm$ 0.02*
	60	228 $\pm$ 12.7	265 $\pm$ 11.7*	7 $\pm$ 2.2	1.55 $\pm$ 0.03*
	100	257 $\pm$ 26.1	234 $\pm$ 23.4*	7 $\pm$ 3.2	1.49 $\pm$ 0.07*
Control	-	125 $\pm$ 12.9	350 $\pm$ 14.3	23 $\pm$ 2.4	1.77 $\pm$ 0.03
GSNO	3	134 $\pm$ 20.0	355 $\pm$ 20.9	11 $\pm$ 2.0	1.78 $\pm$ 0.05
	10	204 $\pm$ 9.5	280 $\pm$ 9.6*	16 $\pm$ 0.8	1.62 $\pm$ 0.01*
	30	236 $\pm$ 3.6	245 $\pm$ 6.2*	19 $\pm$ 3.2	1.57 $\pm$ 0.04*
	60	250 $\pm$ 17.3	233 $\pm$ 16.7*	17 $\pm$ 3.3	1.55 $\pm$ 0.04*
Control	-	125 $\pm$ 5.8	350 $\pm$ 6.2	23 $\pm$ 2.4	1.77 $\pm$ 0.03
SNP	10	147 $\pm$ 5.8	333 $\pm$ 4.5	20 $\pm$ 2.0	1.73 $\pm$ 0.04
	30	154 $\pm$ 6.3	328 $\pm$ 7.3*	18 $\pm$ 4.4	1.70 $\pm$ 0.02*
	60	171 $\pm$ 9.0	326 $\pm$ 8.5*	3 $\pm$ 2.6	1.69 $\pm$ 0.02*
	100	190 $\pm$ 12.1	300 $\pm$ 13.1*	10 $\pm$ 3.5	1.67 $\pm$ 0.02*

Data are shown as mean  $\pm$  S. E..

n = 4-8 from 2-3 replicate cultures for each treatment group.

\*P < 0.05 as compared with control

$$\text{NDI} = (1 \times \text{I N}) + (2 \times \text{II N}) + (3 \times \text{III N-IVN}) / 500$$

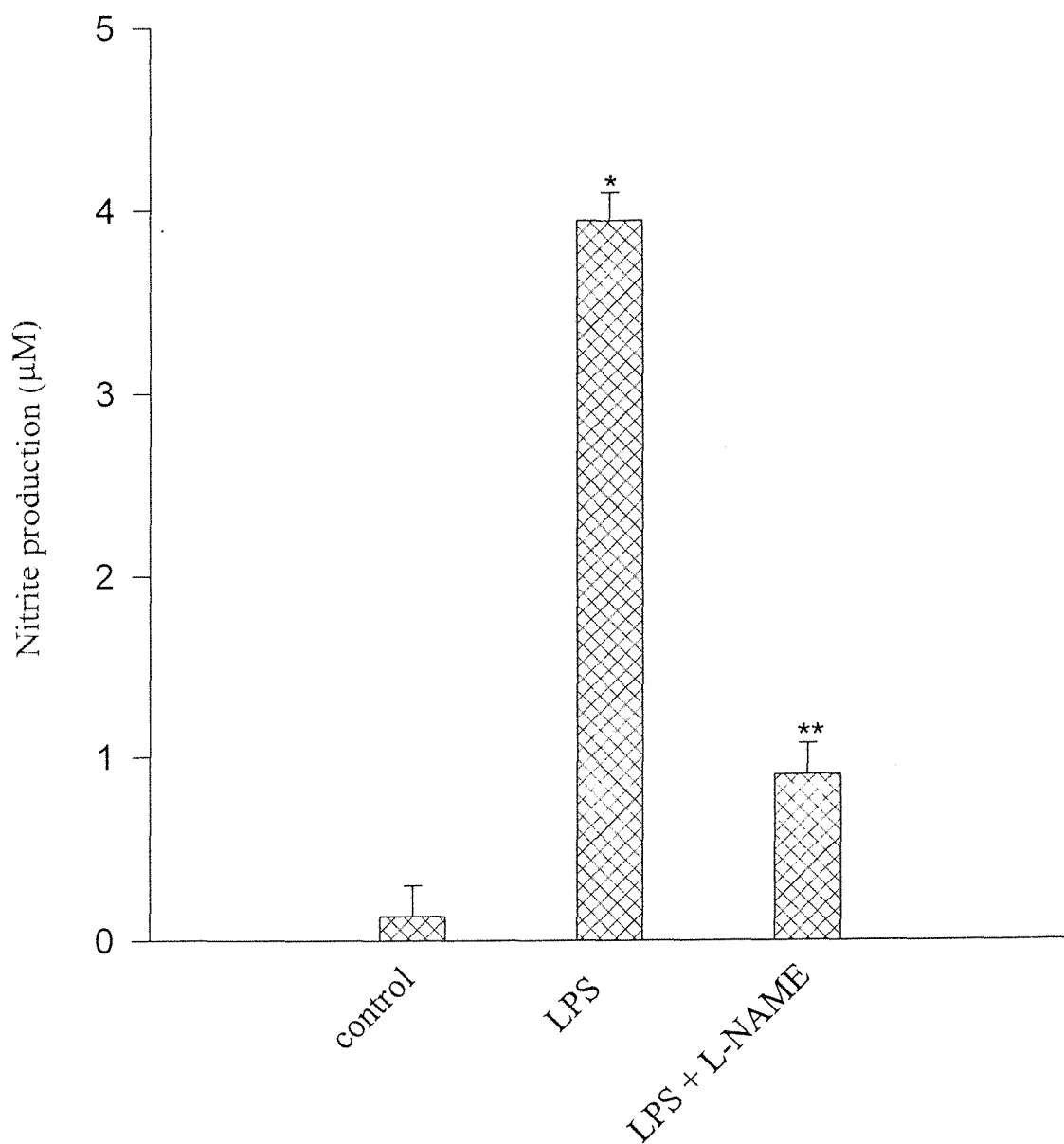


Fig. 1. Effect of 200  $\mu$ M L-NAME on 30  $\mu$ g/ml LPS induced nitrite production in RAW 264.7 macrophages. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.. \*P < 0.05 as compared with control. \*\*P < 0.05 as compared with LPS alone.

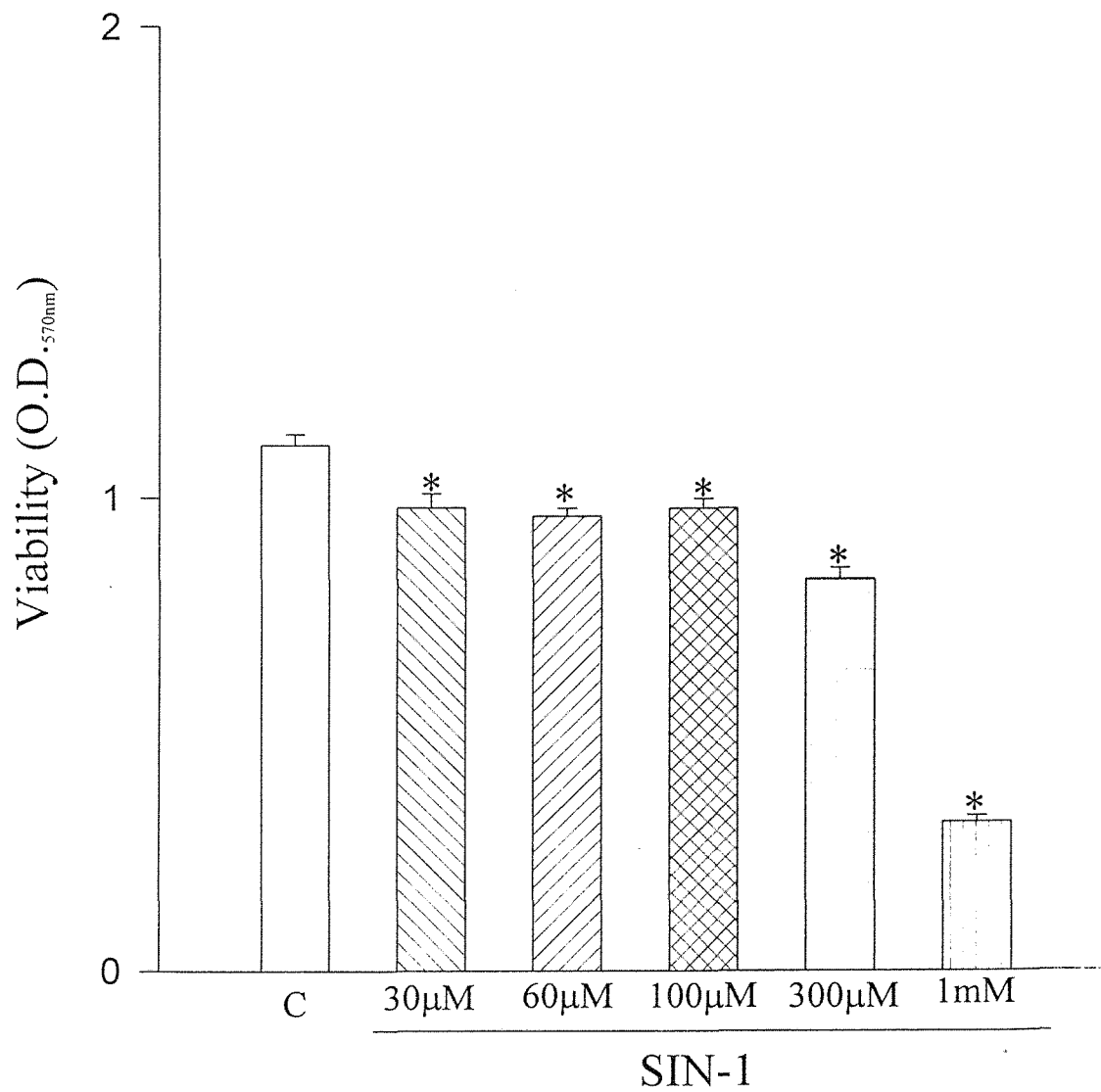


Fig. 2. Cytotoxic effect of SIN-1 in RAW 264.7 macrophages in 12hrs incubation. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.. \*P < 0.05 as compared with control.

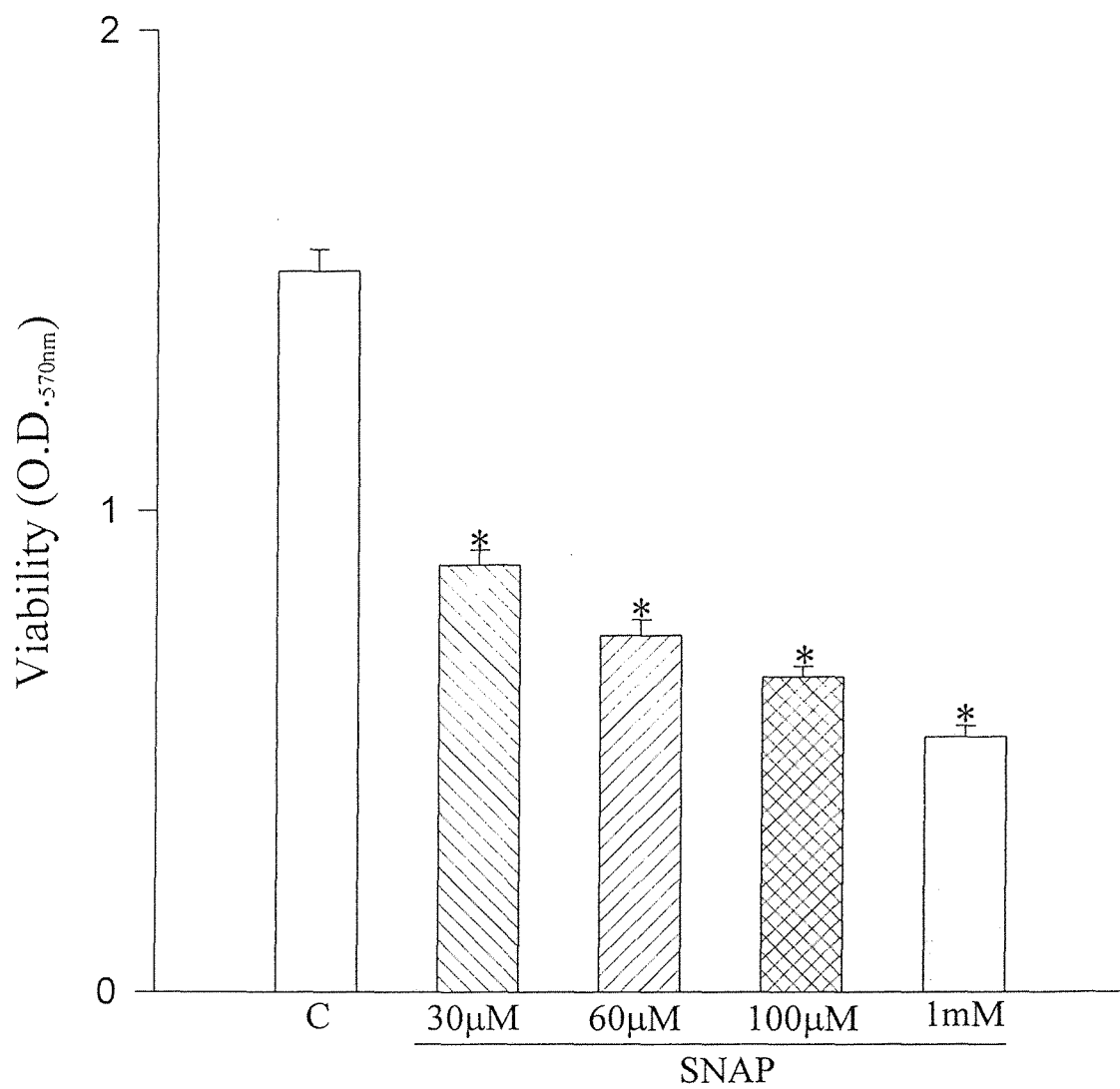


Fig. 3. Cytotoxic effect of SNAP in RAW 264.7 macrophages in 12hrs incubation. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.. \*P < 0.05 as compared with control.

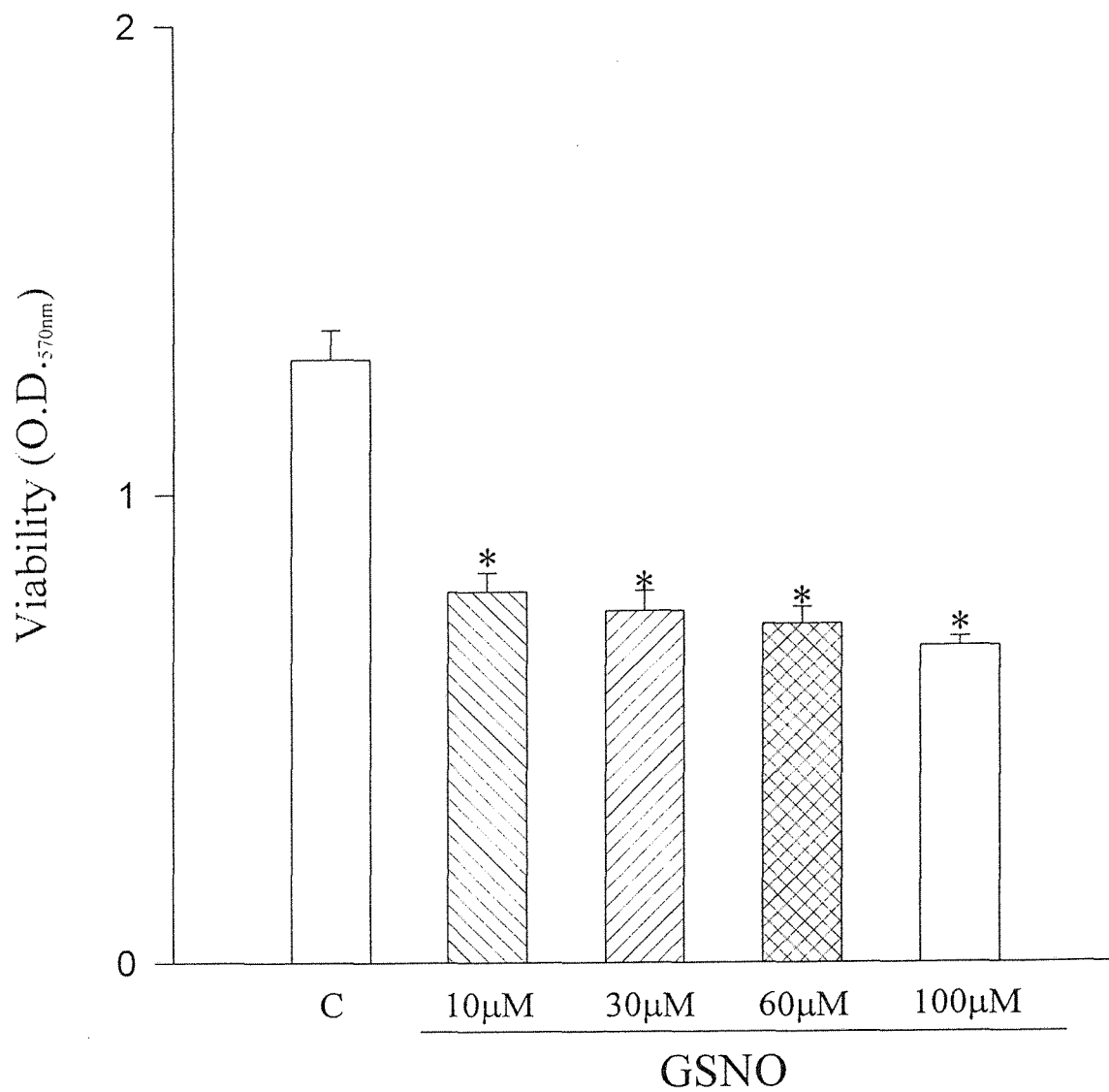


Fig. 4. Cytotoxic effect of GSNO in RAW 264.7 macrophages in 12hrs incubation. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.. \*P < 0.05 as compared with control.



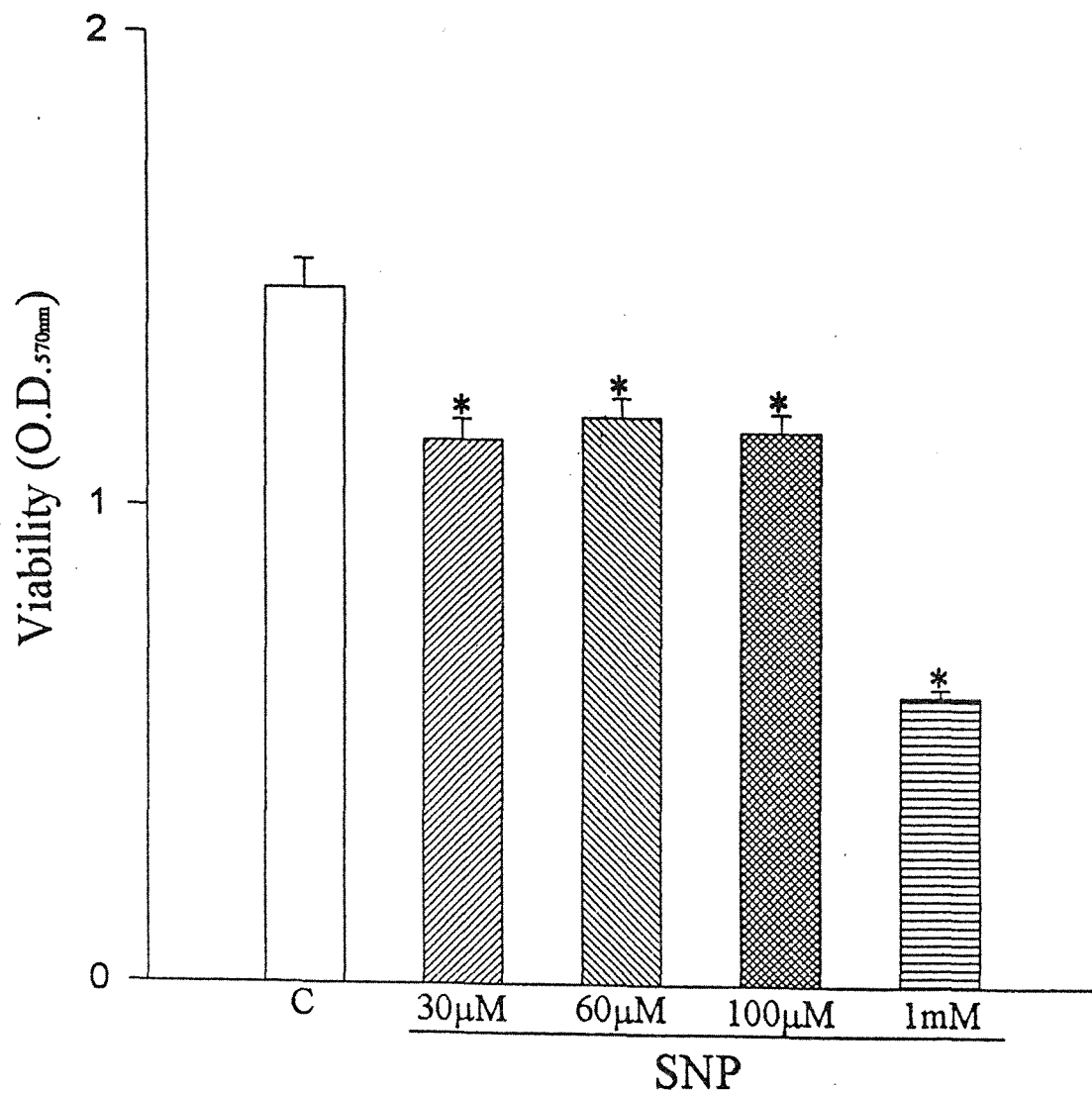


Fig. 5. Cytotoxic effect of SNP in RAW 264.7 macrophages in 12hrs incubation. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.. \*P < 0.05 as compared with control.

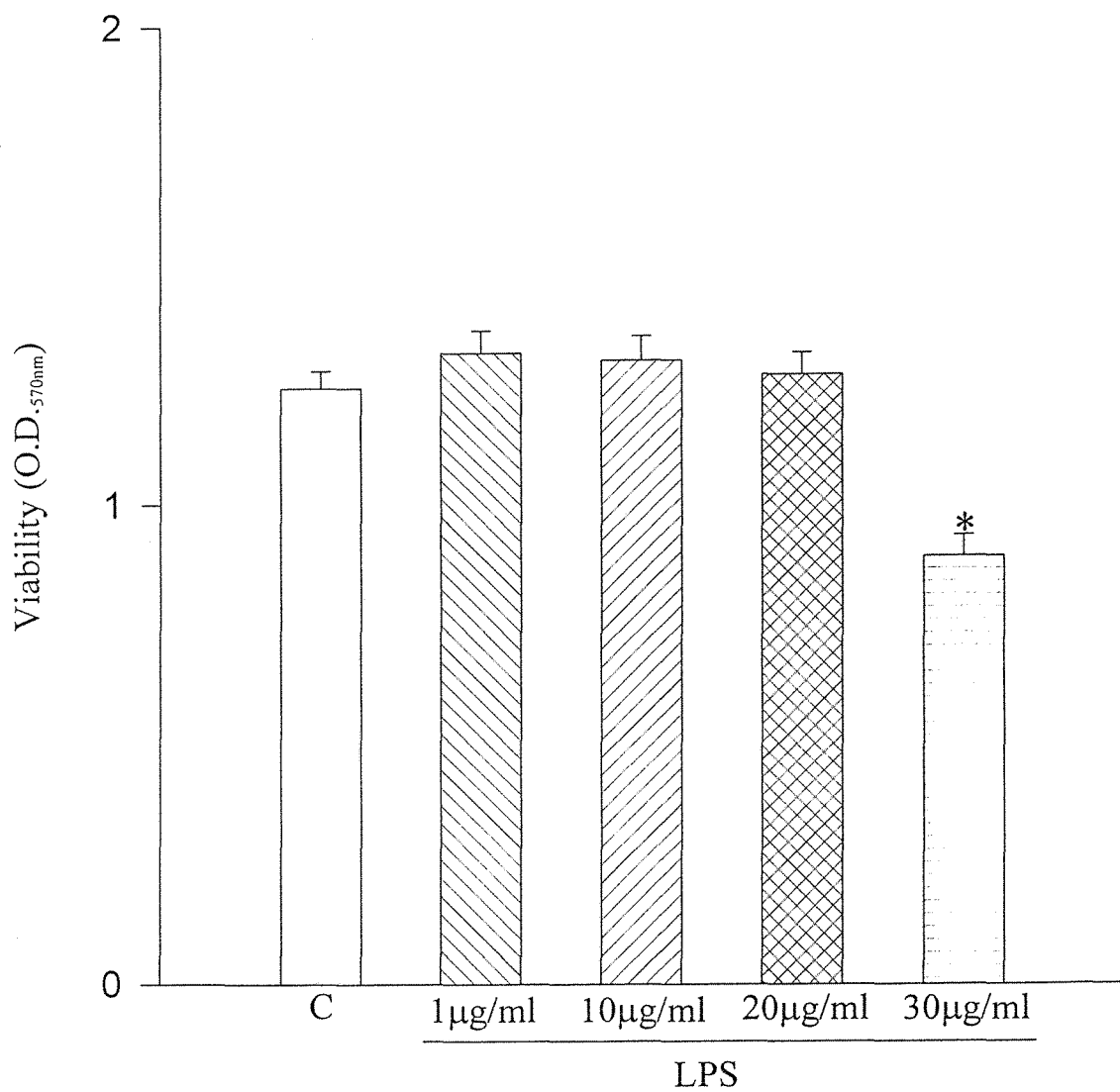


Fig. 6. Cytotoxic effect of LPS in RAW 264.7 macrophages in 2hrs incubation. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.. \*P < 0.05 as compared with control.

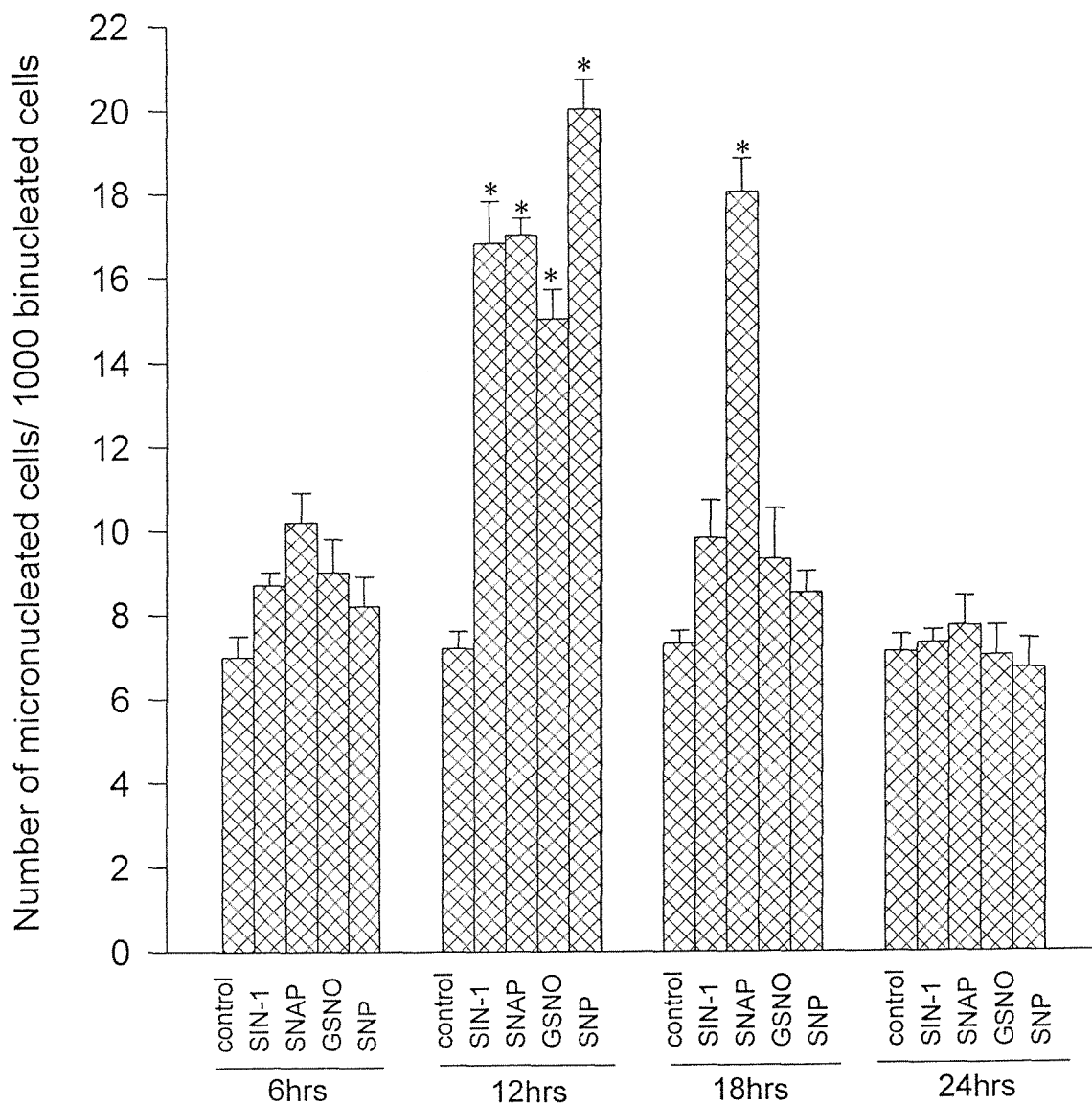


Fig. 7. Effect of 30  $\mu$ M NO donors, SIN-1, SNAP, GSNO, and SNP, on micronucleus induction in RAW 264.7 macrophages in different culture time. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.. \*P < 0.05 as compared with control.

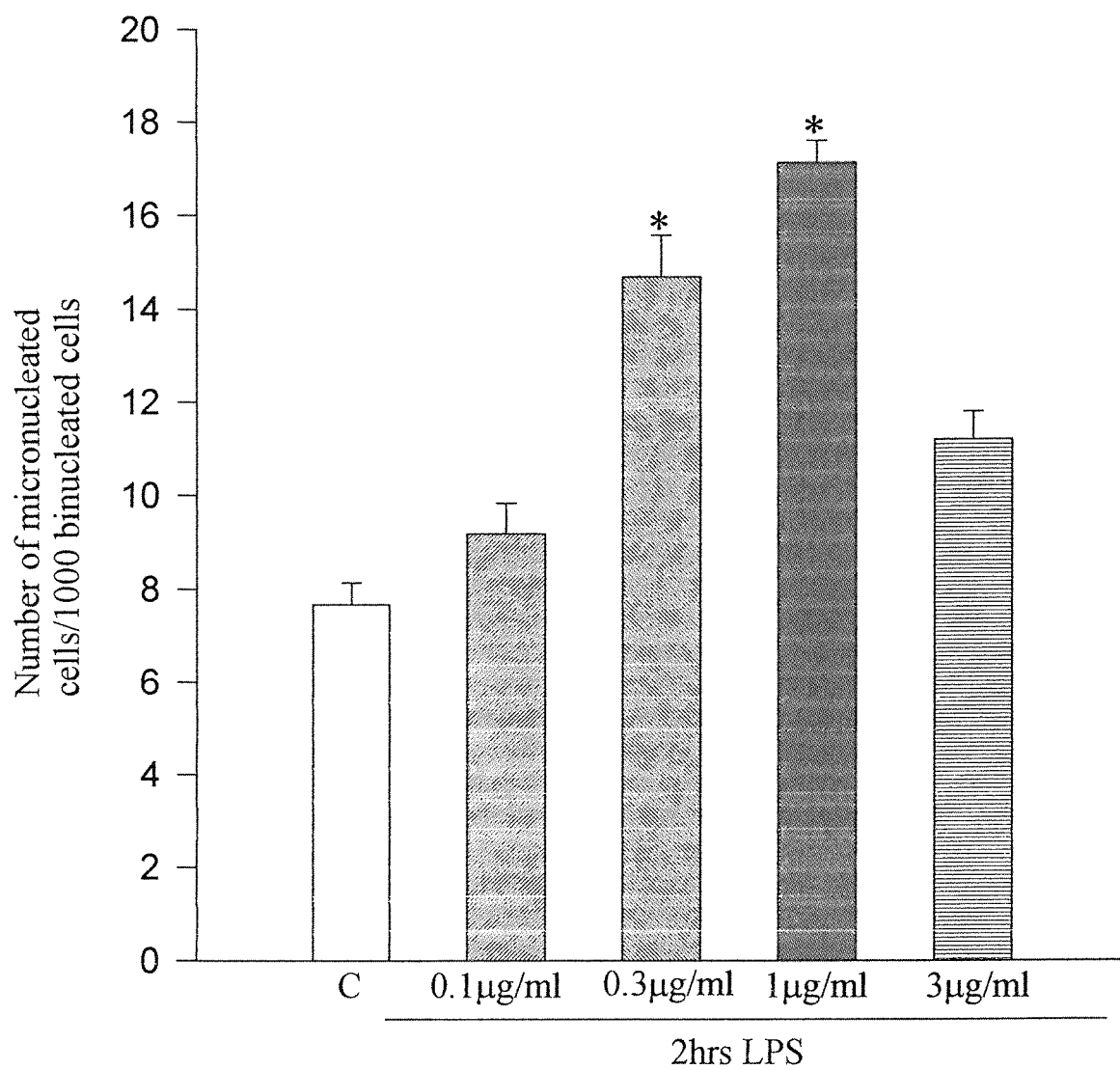


Fig. 8. Effect of lipopolysaccharide (LPS) on micronucleus induction in RAW 264.7 macrophages in 2hrs incubation. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.. \*P < 0.05 as compared with control.

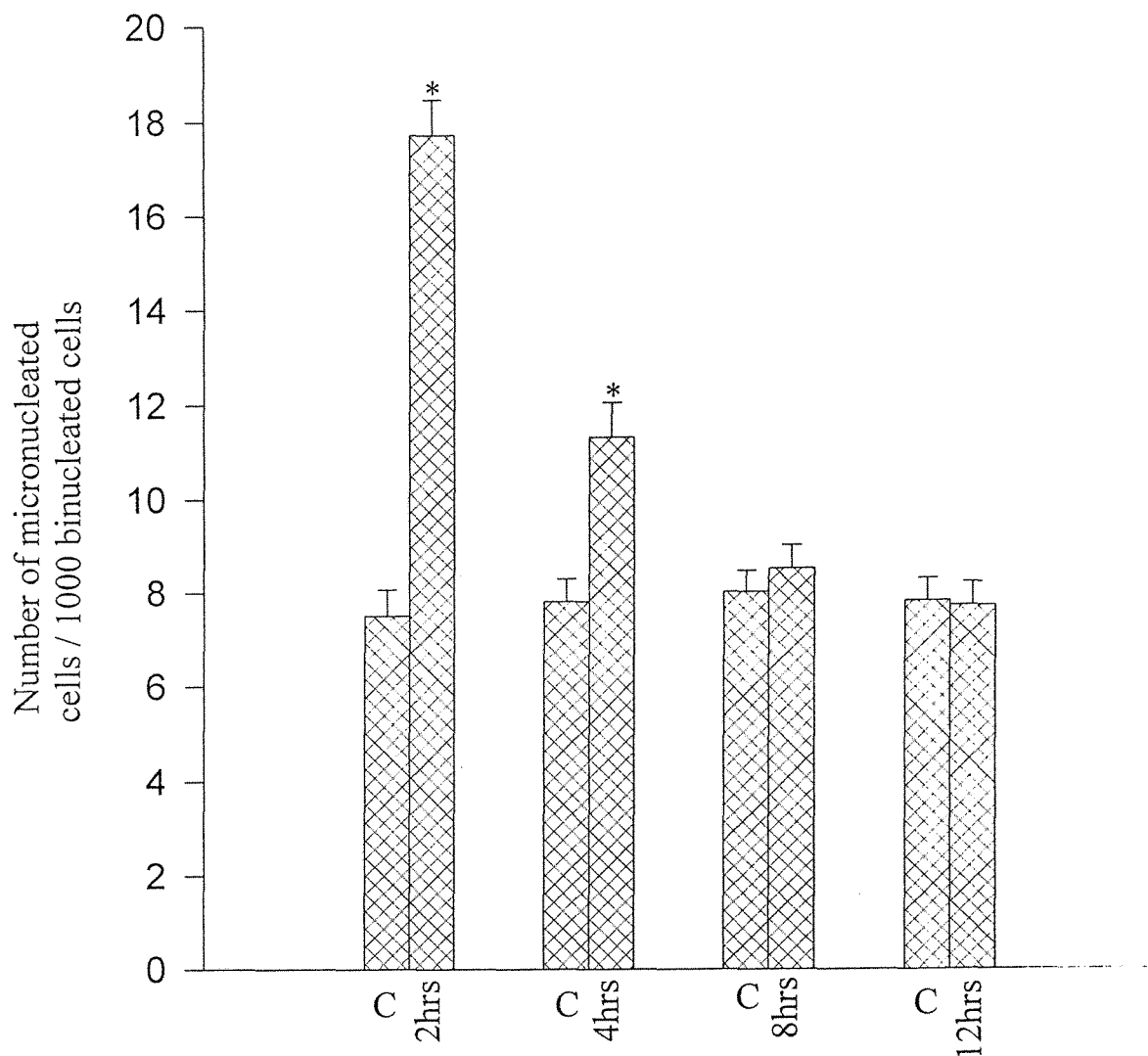


Fig. 9. Effect of lipopolysaccharide (LPS) on micronucleus induction in RAW 264.7 macrophages in different time. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.. \*P < 0.05 as compared with control.

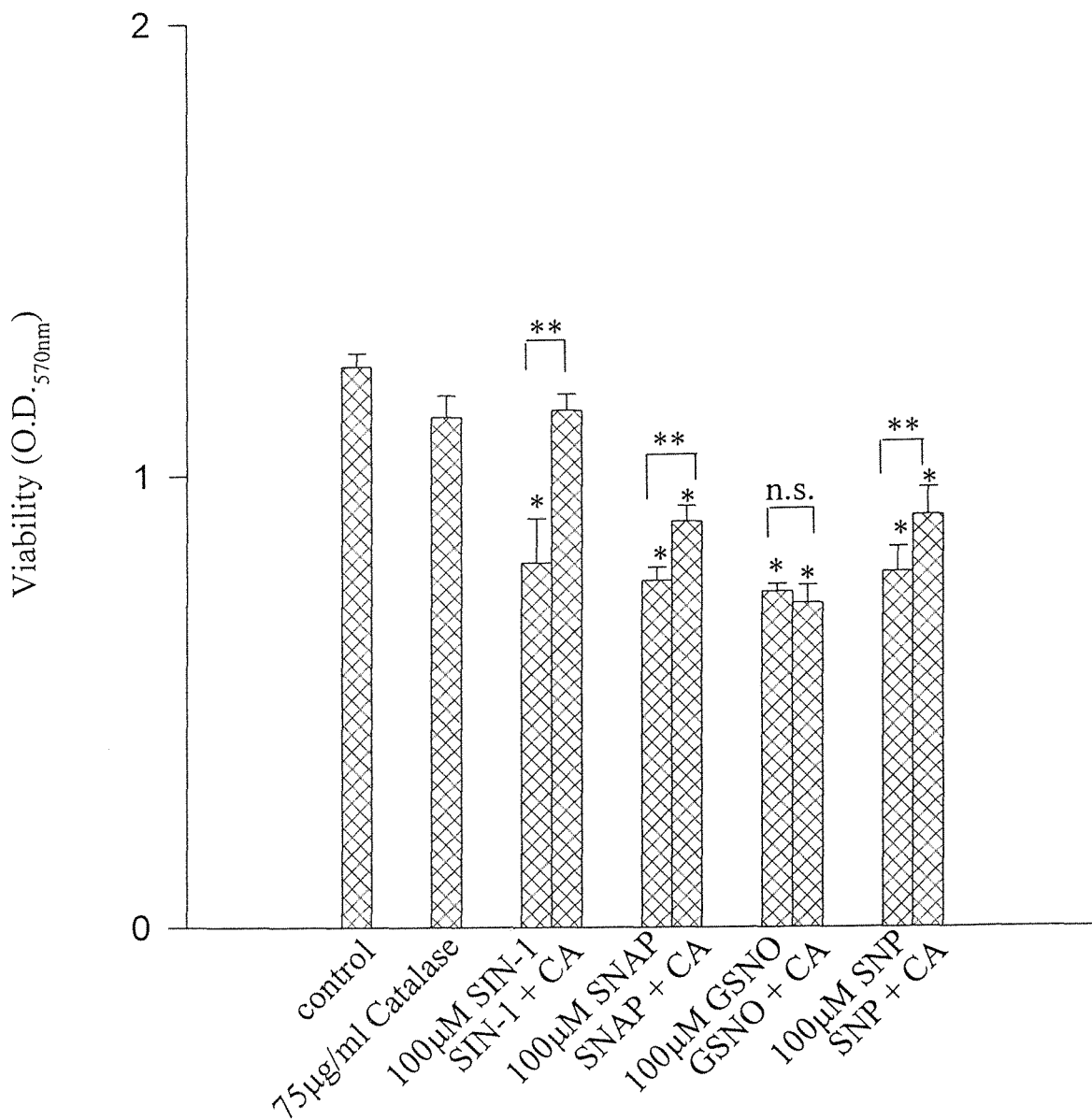


Fig. 10. Effect of Catalase (CA) on different NO donors induced cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.. \*P < 0.05 as compared with control. \*\*P < 0.05 as compared with different NO donors alone, respectively.

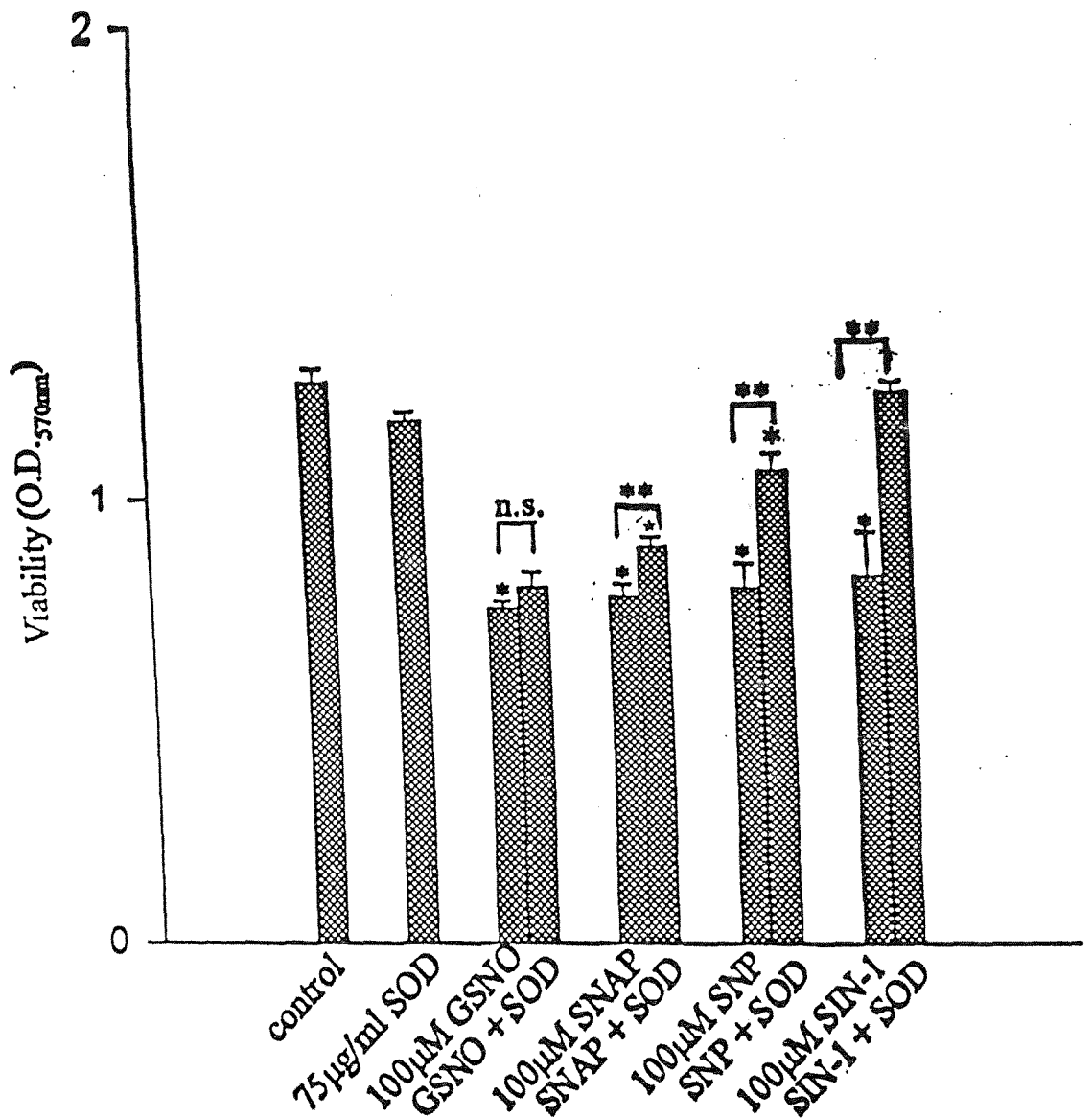


Fig. 11. Effect of SOD on different NO donors induced cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.. \*\* $P < 0.05$  as compared with different NO donors alone, respectively. \* $P < 0.05$  as compared with control.

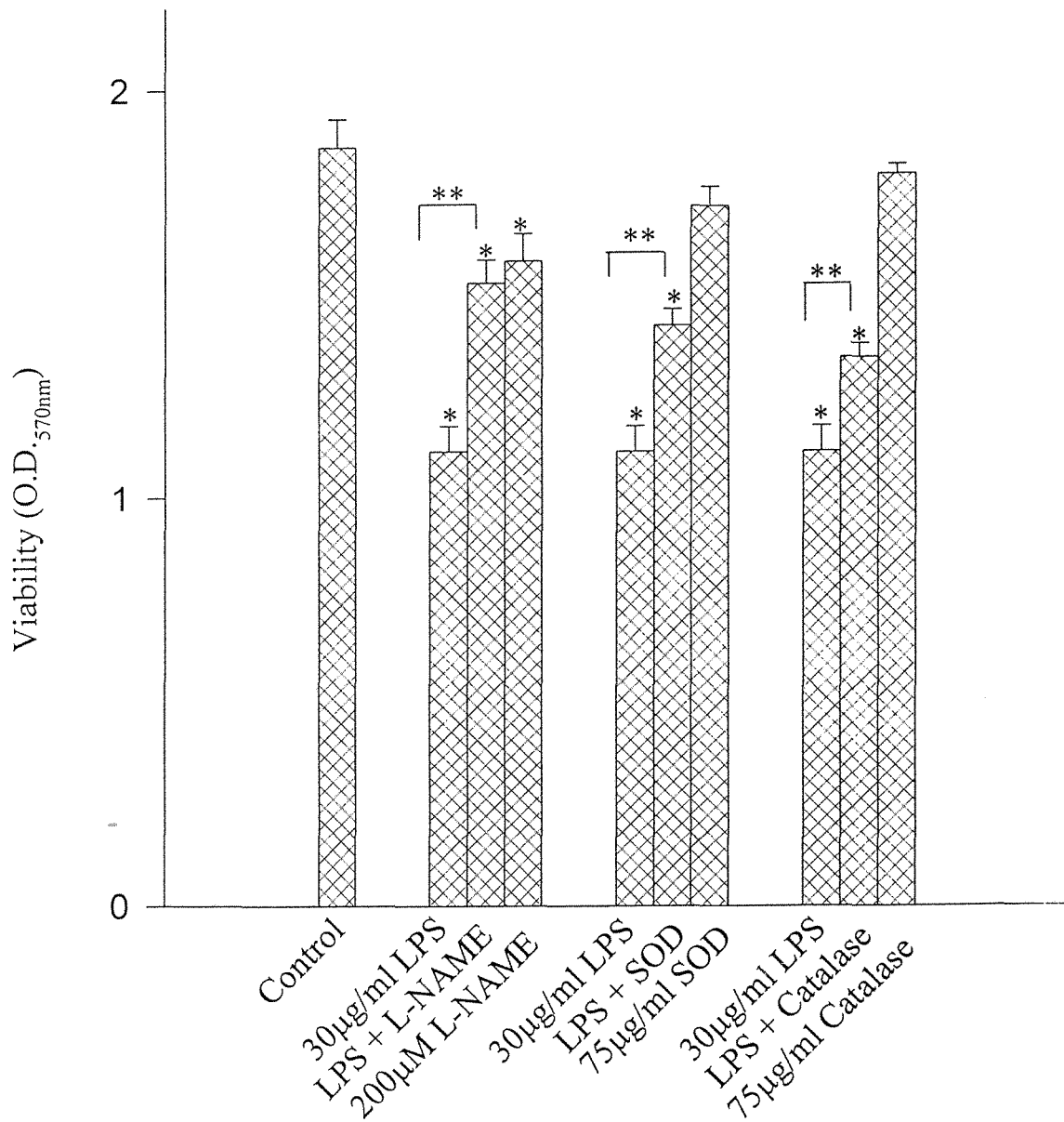


Fig. 12. Effect of L-NAME, Catalase or SOD on LPS induced cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.. \*P < 0.05 as compared with control. \*\*P < 0.05 as compared with LPS alone.



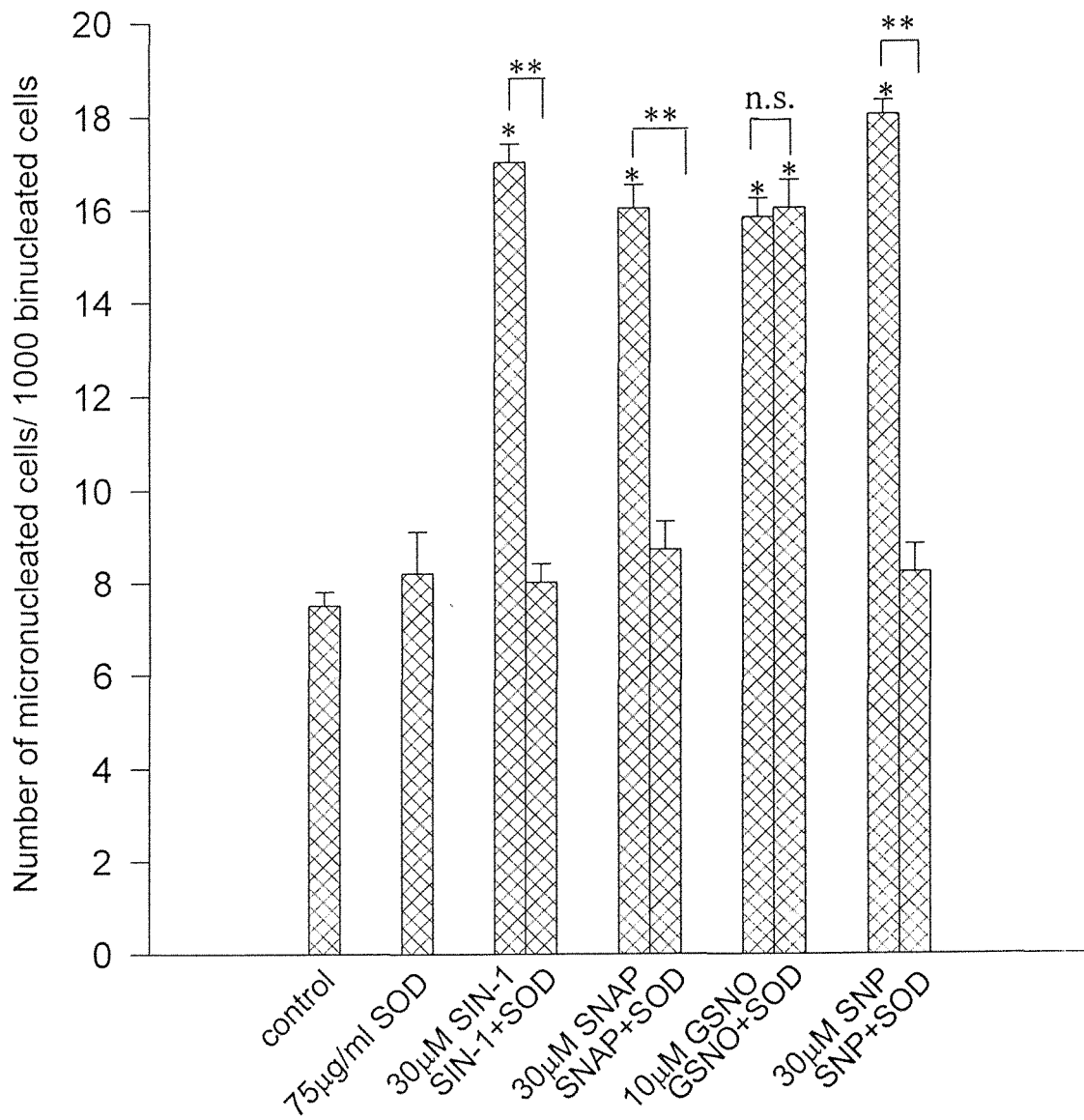


Fig. 13. Genotoxic interactions among 75  $\mu$  g/ml SOD with different NO donors in RAW 264.7 macrophages. Data are shown as mean  $\pm$  S. E.. \*P < 0.05 as compared with control. \*\*P < 0.05 as compared with different NO donors alone, respectively.

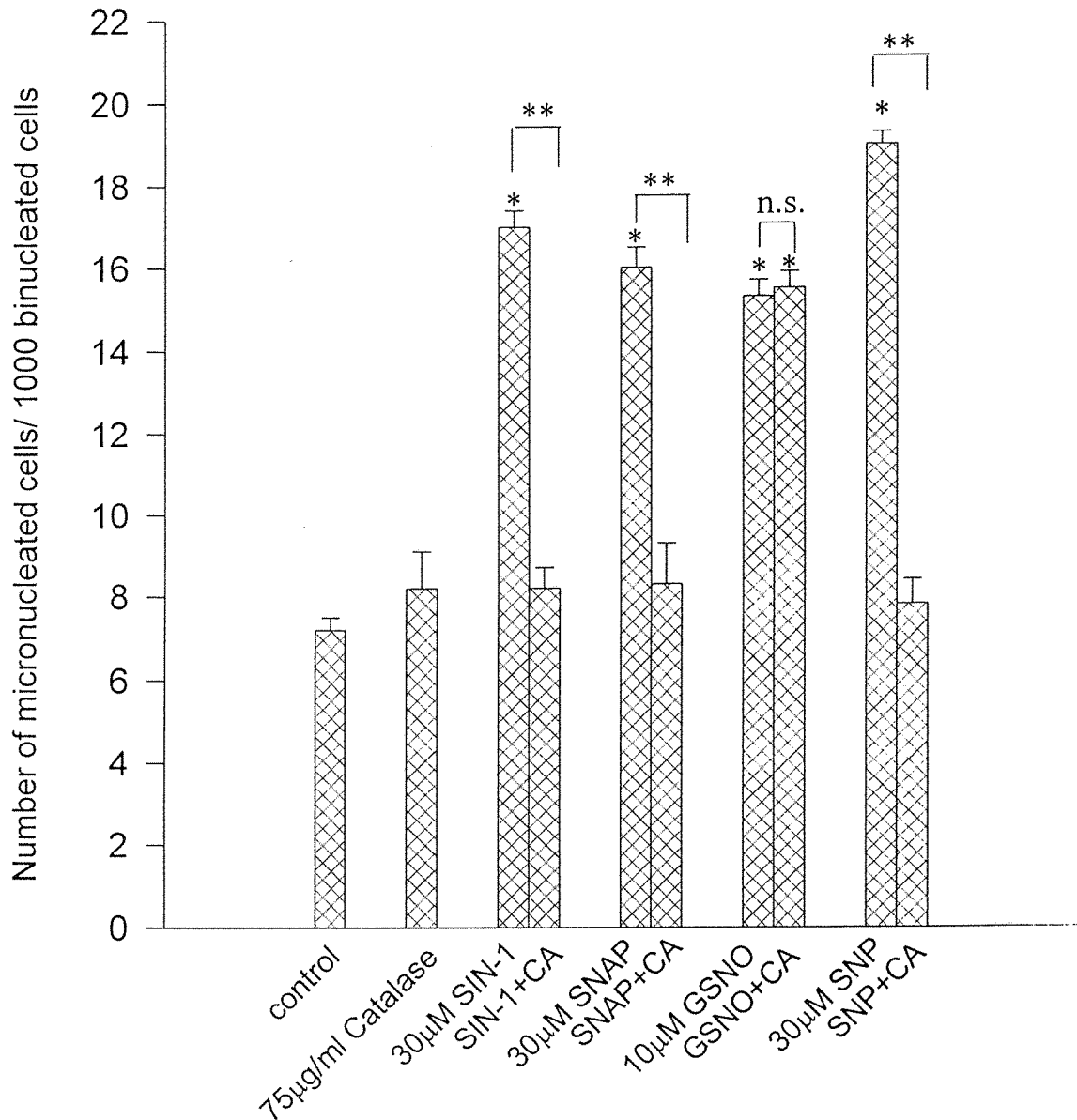


Fig. 14. Genotoxic interactions among 75 µg/ml Catalase with different NO donors in RAW 264.7 macrophages. Data are shown as mean ± S. E.. \*P < 0.05 as compared with control. \*\*P < 0.05 as compared with different NO donors alone, respectively.

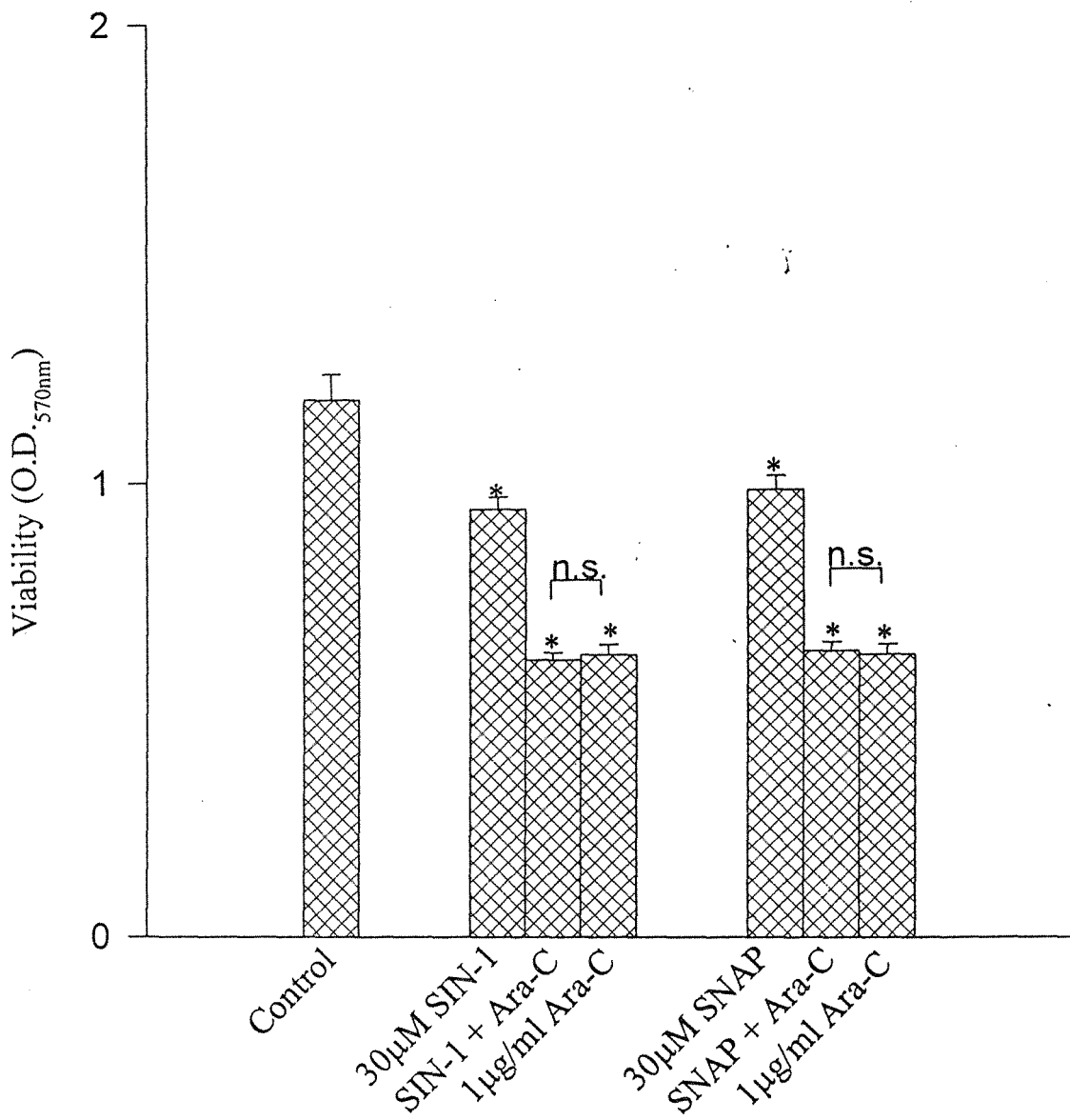


Fig. 15. Cytotoxic interactions among Ara- C with different NO donors in RAW 264.7 macrophages. Data are shown as mean  $\pm$  S. E.. \*P < 0.05 as compared with control. \*\*P < 0.05 as compared with different NO donors alone, respectively.

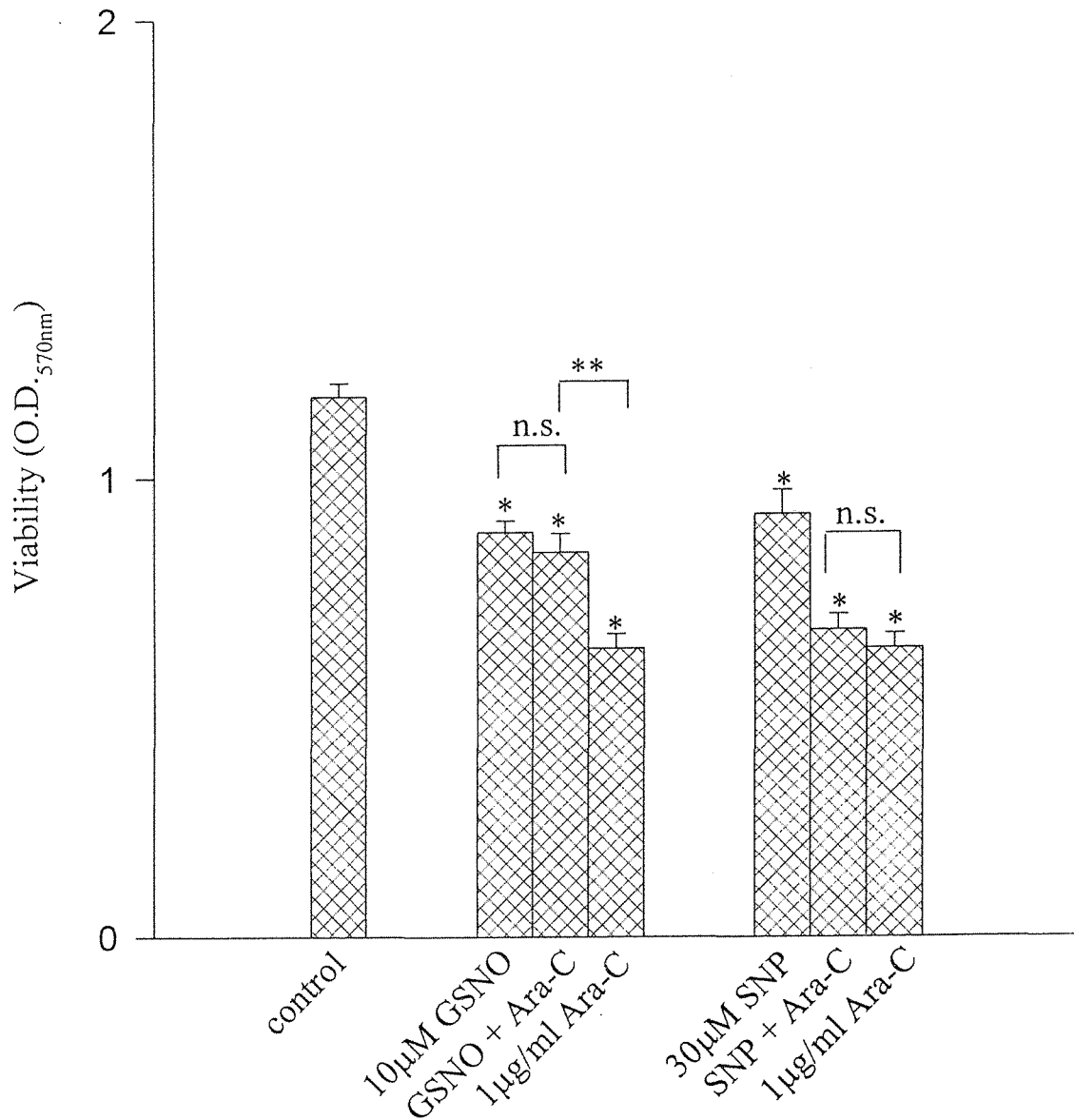


Fig. 16. Cytotoxic interactions among Ara- C with different NO donors in RAW 264.7 macrophages. Data are shown as mean  $\pm$  S. E.. \*P < 0.05 as compared with control. \*\*P < 0.05 as compared with different NO donors alone, respectively.

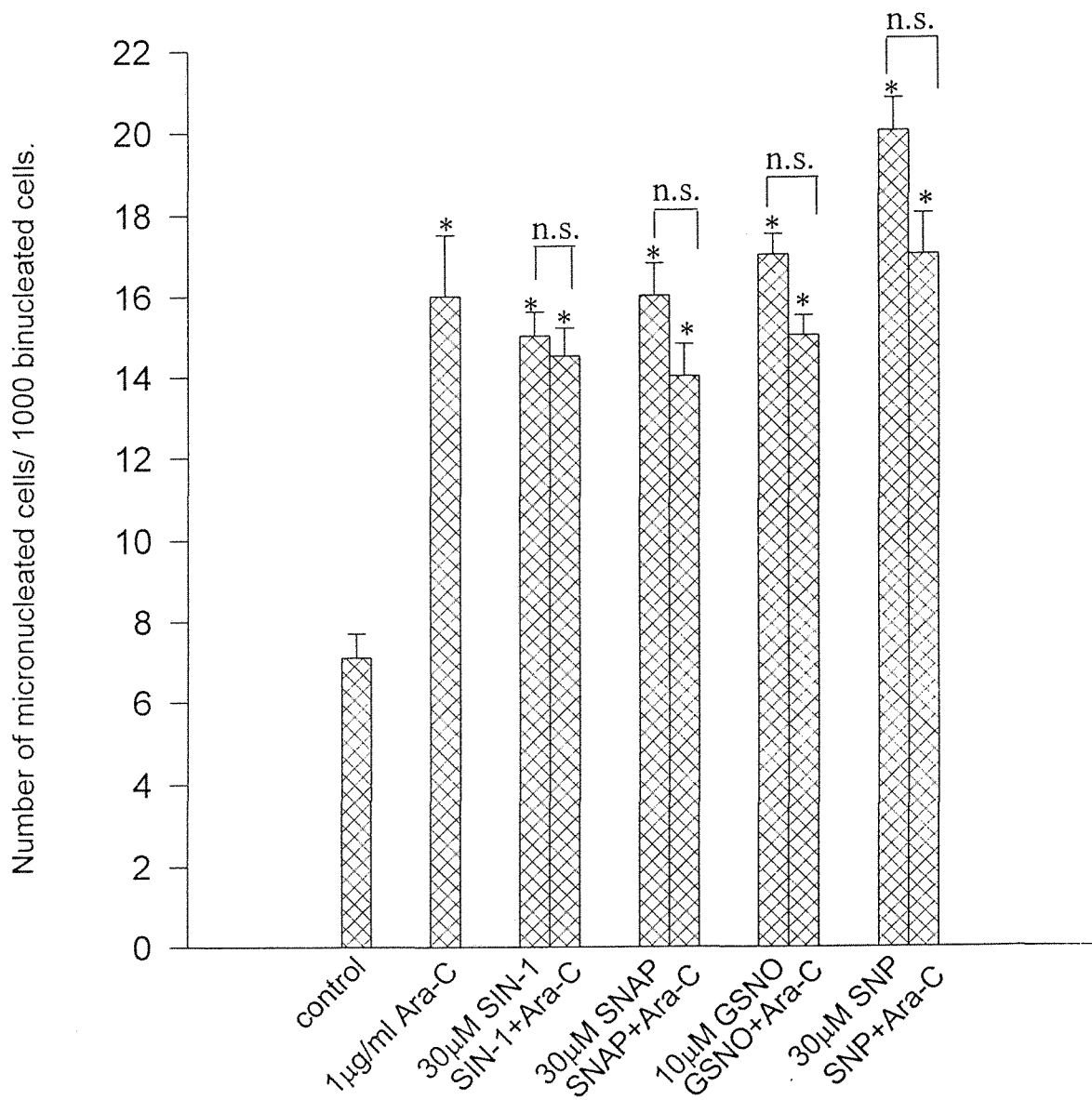


Fig. 17. Genotoxic interactions among 1  $\mu$  g/ml Ara- C with different NO donors in RAW 264.7 macrophages. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.. \*P < 0.05 as compared with control.

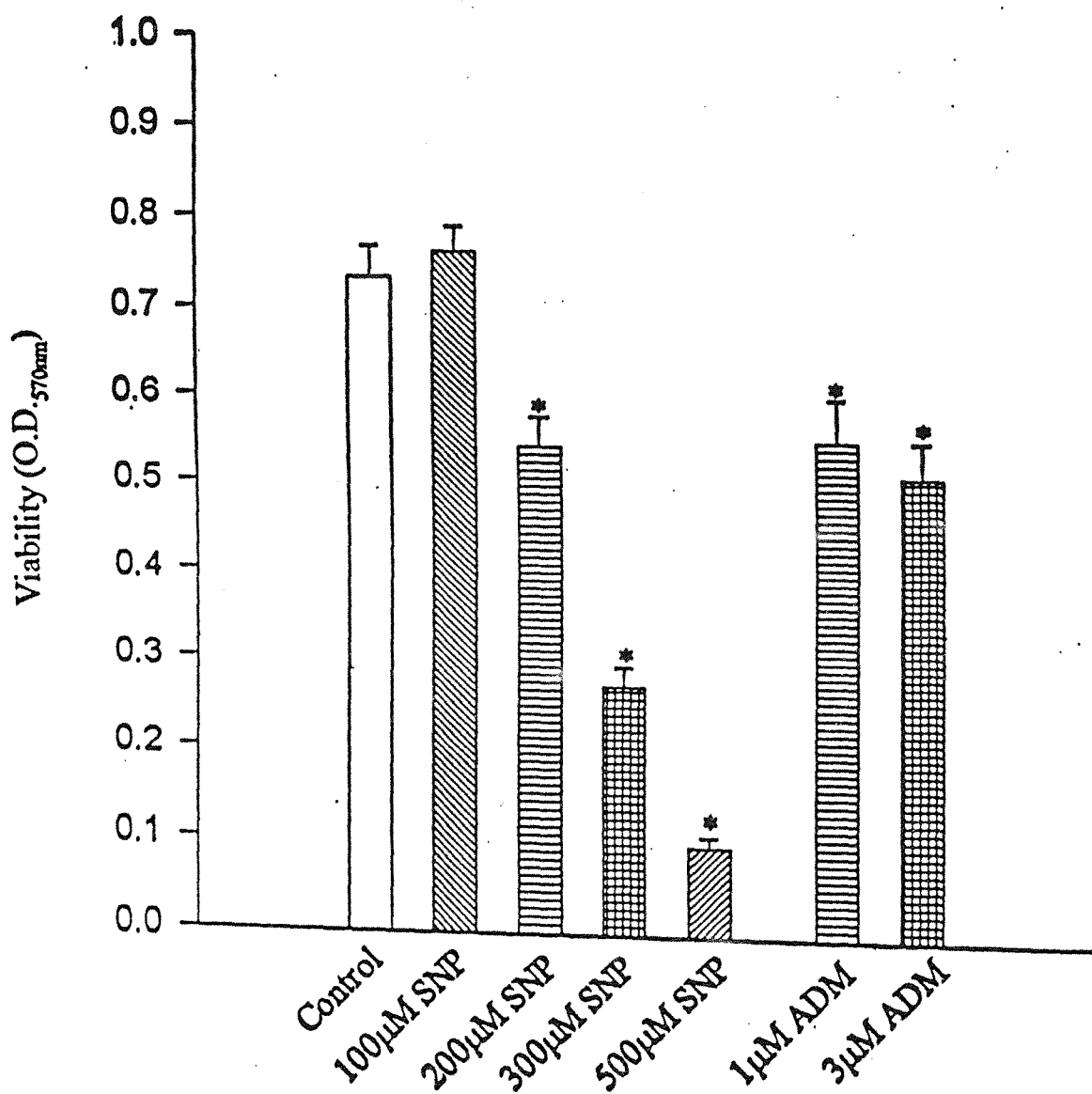


Fig. 18. SNP or ADM induced cytotoxicity in a concentration dependent manner in LLC. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.. \*P < 0.05 as compared with different NO donors alone, respectively.

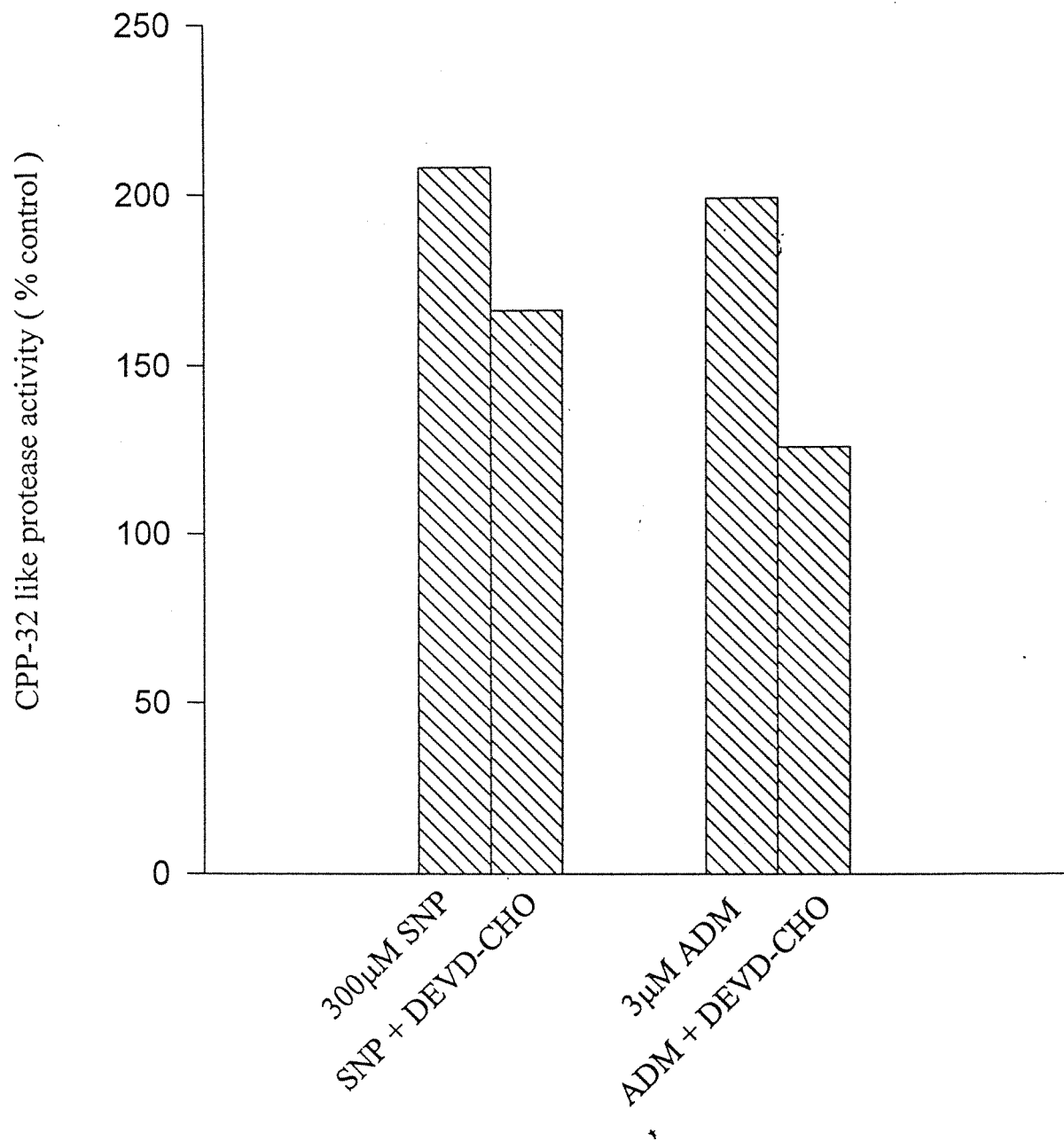


Fig. 19. CPP-32-like protease activity in LLC (Lewis lung carcinoma) treated with 300µM SNP or 3µM ADM for 12hrs.

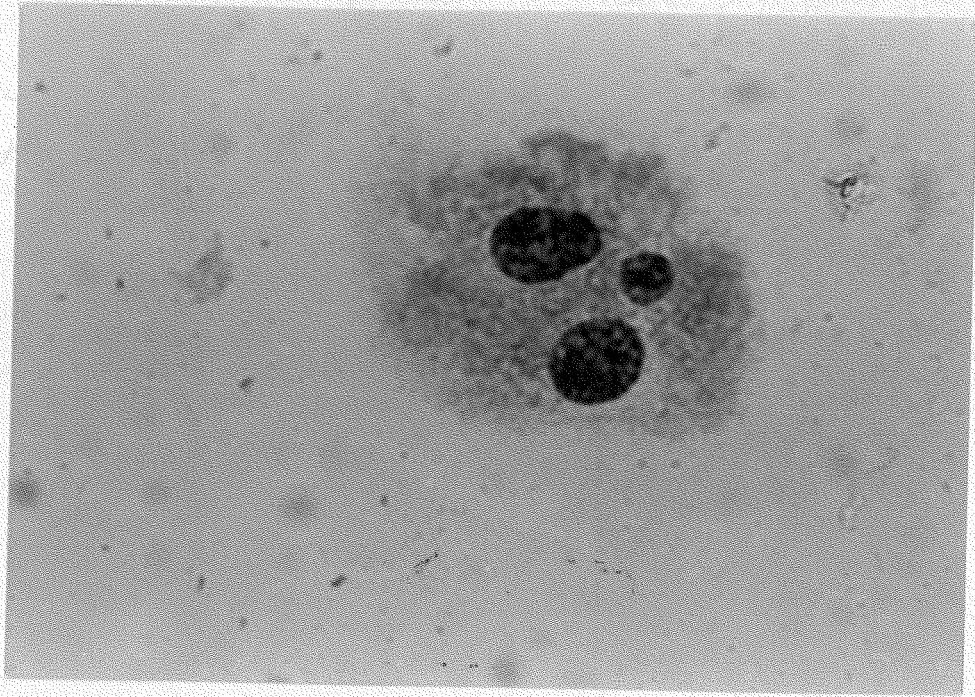


Fig. 20 Micronucleated cell (400×).

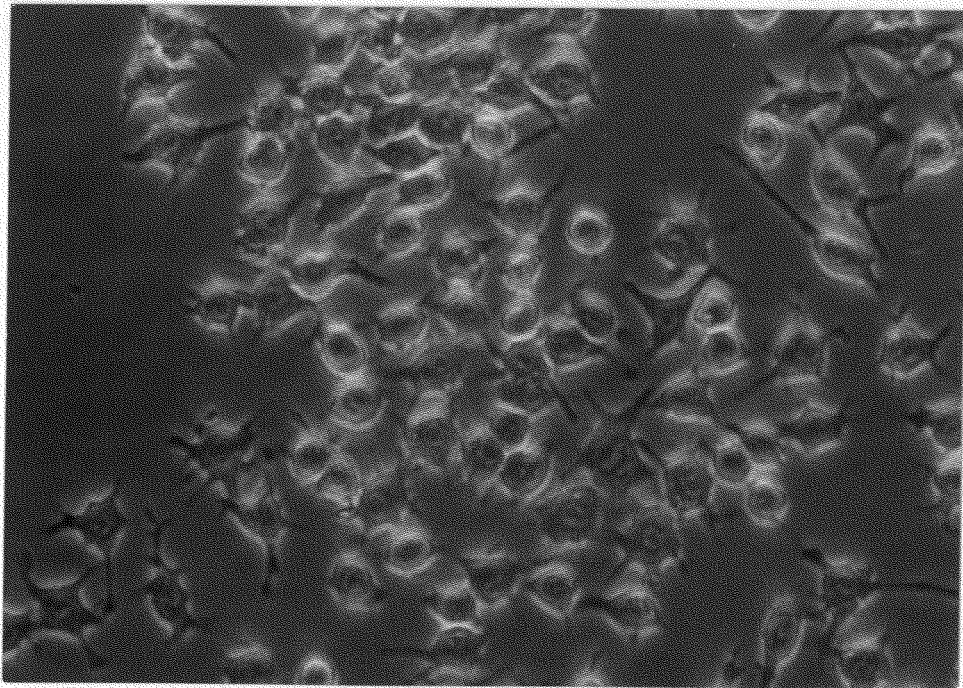


Fig. 21 Untreated RAW 264.7 macrophages (400×).



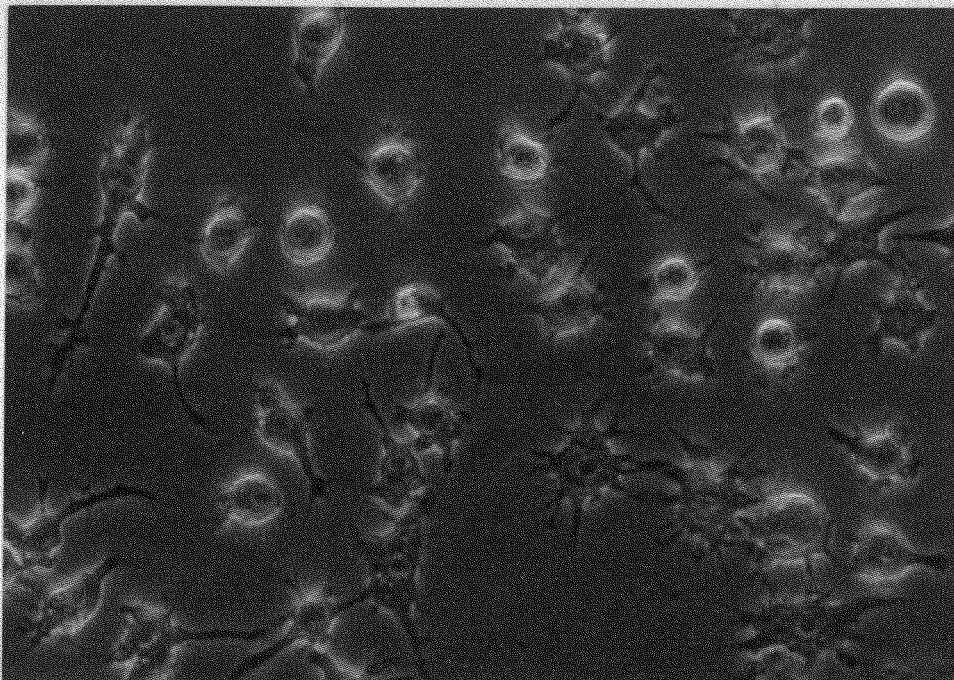


Fig. 22 Photomicrograph showing changes in cellular morphology induced by SIN-1. RAW 264.7 macrophages were incubated with 1mM SIN-1 for 12h (400 $\times$ ).

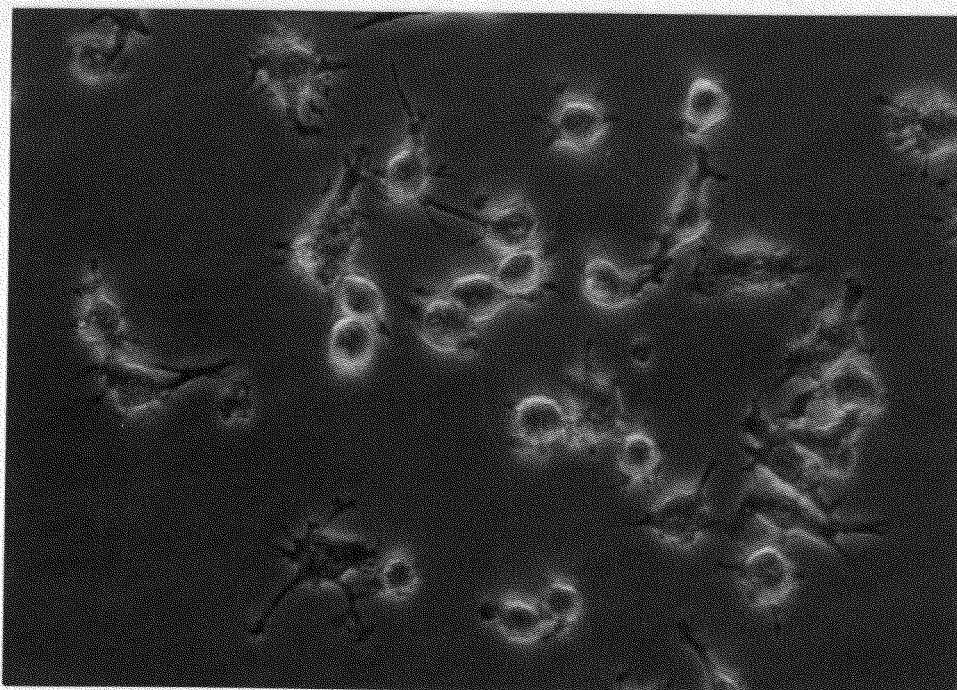


Fig. 23 Photomicrograph showing changes in cellular morphology induced by SNAP. RAW 264.7 macrophages were incubated with 100  $\mu$ M SNAP for 12h (400 $\times$ ).

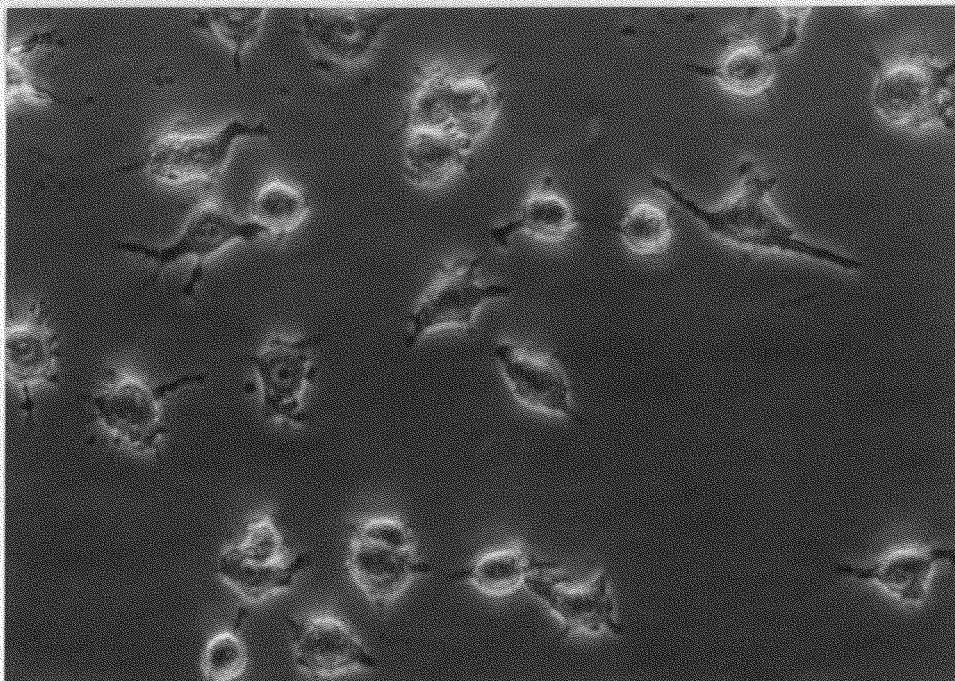


Fig. 24 Photomicrograph showing changes in cellular morphology induced by GSNO. RAW 264.7 macrophages were incubated with 100  $\mu$ M GSNO for 12h (400 $\times$ ).

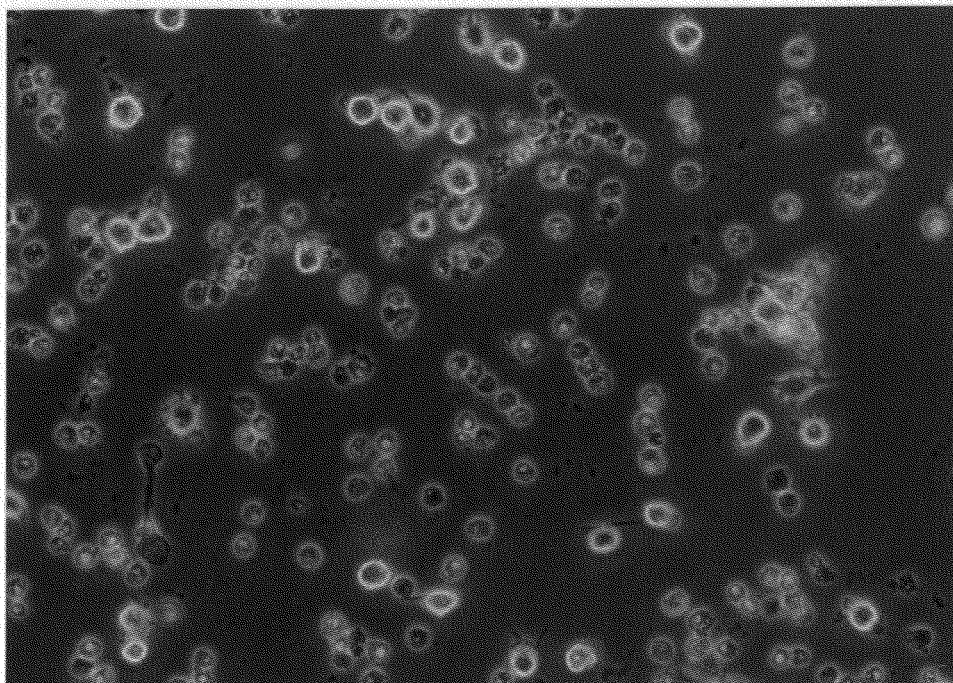


Fig. 25 Photomicrograph showing changes in cellular morphology induced by SNP. RAW 264.7 macrophages were incubated with 1mM SNP for 12h (200 $\times$ ).

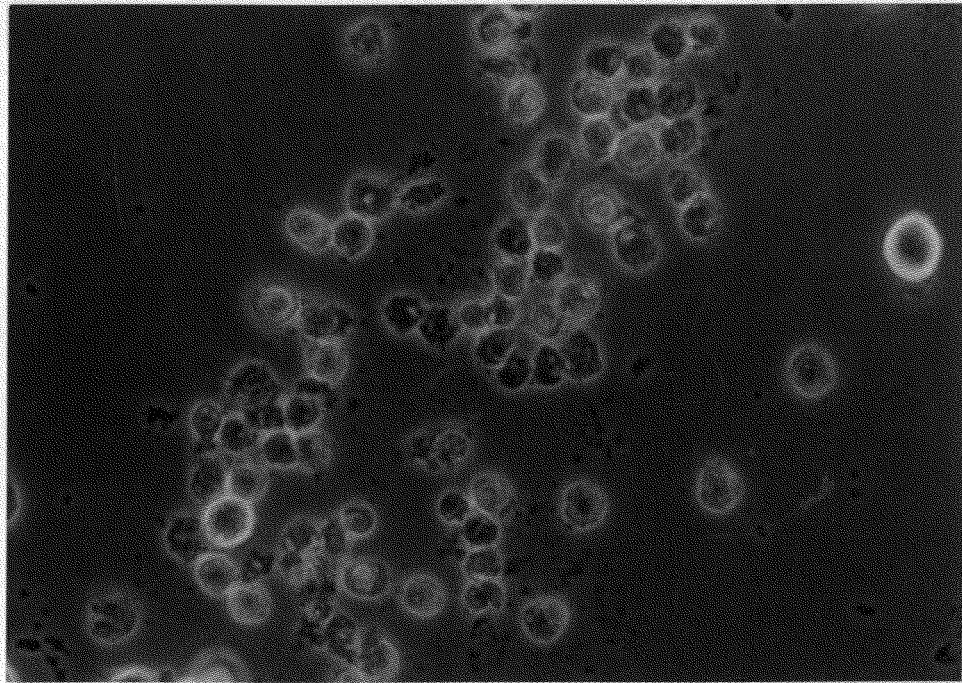


Fig. 26 Photomicrograph showing changes in cellular morphology induced by SNP. RAW 264.7 macrophages were incubated with 1mM SNP for 12h (400 $\times$ ).

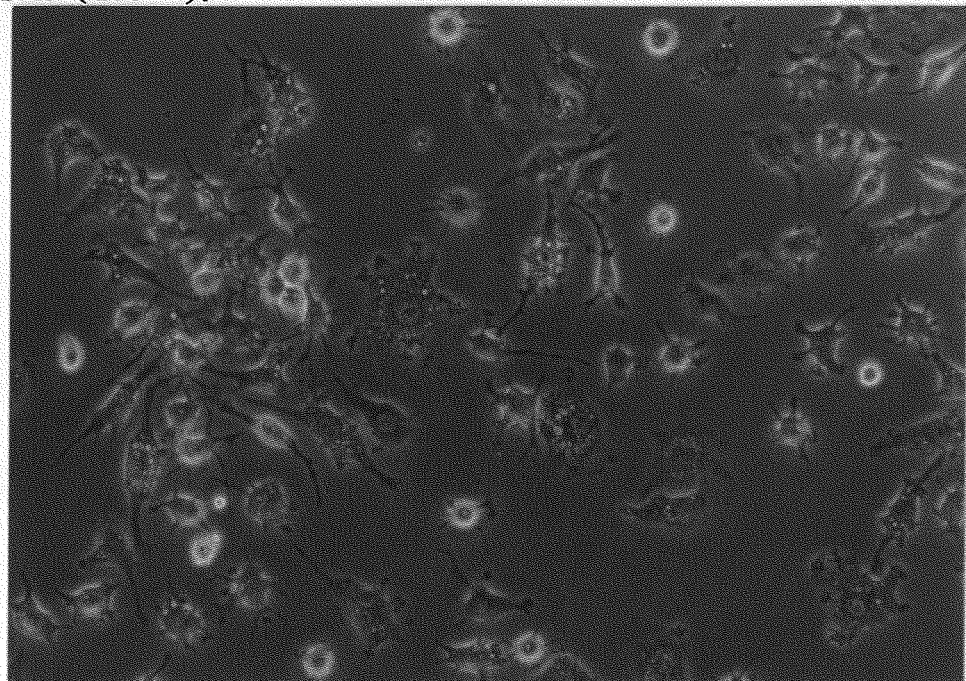


Fig. 27 Photomicrograph showing changes in cellular morphology induced by LPS. RAW 264.7 macrophages were incubated with 30  $\mu$ g/ml LPS for 12h (200 $\times$ ).

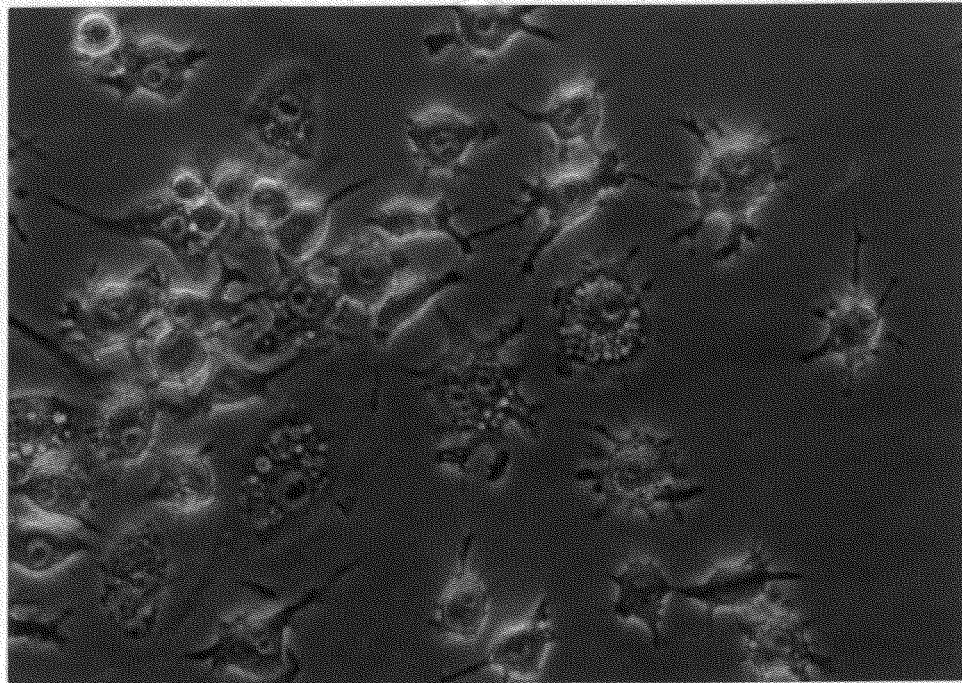


Fig. 28 Photomicrograph showing changes in cellular morphology induced by LPS. RAW 264.7 macrophages were incubated with 30  $\mu\text{g/ml}$  LPS for 12h (400 $\times$ ).

## 参考文献 (References)

- Abat A. and Schroder H. (1998): Protease inhibitors protect macrophages from lipopolysaccharide-induced cytotoxicity: possible role for NF- $\kappa$ B. *Life Sci.* 62: 1081 - 1088.
- Abd-El-Basset E. and Fedoroff S. (1995): Effect of bacterial wall lipopolysaccharide (LPS) on morphology, motility, and cytoskeletal organization of microglia in cultures. *J. Neurosci. Res.* 41: 222 - 237.
- Adams D. O. (1979): Macrophages. *Method. Enzymol.* LVIII: 494 - 506.
- Adams D. O., and Hamilton T. A. (1984): The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.* 2: 283-318.
- Albina J. E., Cui S., Mateo R. B., Reichner J. S. (1993): Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 150 (11): 5080-5085.
- Albina J. E. and Reichner J. S. (1998): Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer Metast. Rev.* 17: 39 - 53.
- Alnemri E. S., Livingston D. J., Nicholson D. W. (1996): Human ICE/CED-3protease nomenclature. *Cell* 87: 171.
- Andonegui G., Trevani A. S., Gamberale R., Carreras M. C., Poderoso J. J., Giordano M., Geffner J. R. (1999): Effect of nitric oxide donors on oxygen-dependent cytotoxic responses mediated by neutrophils. *J. Immunol.* 162: 2922 - 2930.
- Arroyo P. L., Pigott V. H., Mower H. F., Cooney R. V. (1992): Mutagenicity of nitric oxide and its inhibition by antioxidants. *Mutat. Res.* 281: 193 - 202.
- Azmi S., Bhatia L., Khanna N., Dhawan D., Singh N. (1997): Adriamycin induces apoptosis in rat thymocytes. *Cancer Lett.* 111: 225 - 231.
- Barry M. A., Behnke C. A., Eastman A. (1990): Activation of programmed cell

death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem. Pharmacol.* 40: 2353 – 2362.

Bates J. N., Baker M. T., Guerra R. J. R., Harrison D. G. (1991): Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochem. Pharmacol.* 42: S157 – S165.

Beckman J. S., Beckman T. W., Chen J., Marshall P. A., Freeman B. A. (1990): Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1620 – 1624.

Blackburn R. V., Galoforo S. S., Berns C. M., Motwani N. M., Corry P. M., Lee Y. J. (1998): Differential induction of cell death in human glioma cell lines by sodium nitroprusside. *Cancer* 82: 1137 – 1145.

Blanco F. J., Ochs R. L., Schwarz H., Lotz M. (1995): Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am. J. Pathol.* 146: 75 – 85.

Bredt D. S. and Snyder S. H. (1989): Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9030 – 9033.

Boullerne A. I., Nedelkoska L., Benjamins J. A. (1999): Synergism of nitric oxide and iron in killing the transformed murine oligodendrocyte cell line N20.1. *J. Neurochem.* 72: 1050 – 1060.

Brockhaus F. and Brune B. (1999): Overexpression of CuZn superoxide dismutase protects RAW 264.7 macrophages against nitric oxide cytotoxicity. *Biochem. J.* 338: 295 – 303.

Broillet M. C. and Firestein S. (1996): Direct activation of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel through modification of sulfhydryl groups by NO compounds. *Neuron* 16: 377 – 385.

Brown G. C. (1995): Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur. J. Biochem.* 232: 188 – 191.

Brune B., Gotz C., Meßmer U. K., Sandau K., Hirvonen M. R., Lapetina E. G. (1997): Superoxide formation and macrophages resistance to nitric oxide-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272: 7253 – 7258.

Burney S., Tmir S., Gal A., Tannenbaum S. R. (1997): A mechanistic analysis of nitric oxide – induced cellular toxicity. *Nitric Oxide: Bio. Chem.* 1: 130 – 144.

Carter S. B. (1967): Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature* 213: 261 – 264.

Caselli A., Camici G., Manao G., Moneti G., Pazzagli L., Cappugi G., Ramponi G. (1994): Nitric oxide causes inactivation of the low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* 269: 24878 – 24882.

Chiou W. F., Lin J. J., Chen C. F. (1998): Andrographolide suppresses the expression of inducible nitric oxide synthase in macrophage and restores the vasoconstriction in rat aorta treated with lipopolysaccharide. *Brit. J. Pharmacol.* 125: 327 – 334.

Cohen J. J. (1993): Apoptosis. *Immunol. Today* 14: 126 – 130.

Cohen G. M. (1997): Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326: 1 – 16.

Cuzzocrea S., Caputi A. P., Zingarelli B. (1998): Peroxynitrite-mediated DNA strand breakage activates poly (ADP-ribose) synthetase and causes cellular energy depletion in carrageenan-induced pleurisy. *Immunology* 93: 96 – 101.

Das P. K., Sahu K., Dash B. C. (1994): Induction of chromosome aberrations and micronuclei in pulmonary alveolar macrophages of rats following inhalation of mosquito coil smoke. *Mutat. Res.* 320: 285 – 292.

Dean J. H., Luster M. I., Boorman G. A., Lauer L. D. (1982): Procedure available to examine the immunotoxicity of chemicals and drugs. *Pharmacol. Rev.* 34: 137 – 148.

Delaney C. A., Green I. C., Lowe J. E., Cunningham J. M., Butler A. R., Renton L., D'Costa I., Green M. H. L. (1997): Use of the comet assay to investigate possible interactions of nitric oxide and reactive oxygen species in the induction of DNA damage and inhibition of function in an insulin-secreting cell line. *Mutat. Res.* 375: 137 – 146.

deRojas-Walker T., Tamir S., Ji H., Wishnok J. S., Tannenbaum S. R. (1995): Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophages DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 8: 473 – 477.

Dimmeler S., Haendeler J., Nehls M., Zeiher A. M. (1997): Soppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE)-like and cystein protease protein (CPP)-32-like protease. *J. Exp. Med.* 185: 601 – 607.

Dobashi K., Pahan K., Chahal A., Singh I. (1997): Modulation of endogenous antioxidant enzymes by nitric oxide in rat C<sub>6</sub> glial cells. *J. Neurochem.* 68: 1896 – 1903.

Eastmond D. A. and Tucker J. D. (1989): Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutag.* 13: 34 – 43.

Eigler A., Moeller J., Endres S. (1995): Exogenous and endogenous nitric oxide attenuates tumor necrosis factor synthesis in the macrophage cell line RAW 264.7. *J. Immunol.* 154: 4048 – 4054.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998): A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43 – 50.

Feehlich M., Ostrowski J., Noack E. (1989): On the mechanism of NO release from sydnomines. *J. Cardiovas. Pharmacol.* 14 (suppl. 11): S13 – S22.

Feehlich M. (1991): The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators: appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solutions. *J. Cardiovasc.*



Pharmacol. 17: S25 – S33.

Fehsel K., Kronke K. D., Meyer K. L., Huber H., Wahn W., Kolb-Bachofen V. (1995): Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J. Immunol.* 155: 2858 – 2865.

Fenech M. (1993): The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.* 285: 35 – 44.

Fenech M. and Morley A. A. (1985): Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* 147: 29 – 36.

Fenech M. and Neville S. (1992): Conversion of excision – repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 19: 27 – 36.

Fenech M., Rinaldi J., Surralles J. (1994): The origin of micronuclei induced by cytosine arabinoside and its synergistic interaction with hydroxyurea in human lymphocytes. *Mutagenesis* 9: 273 – 277.

Ferrari M., Fornasiero M. C., Isetta A. M. (1990): MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J. Immunol. Method.* 131: 165 – 172.

Forrester K., Amb S., Lupold S. E., Kapust R. B., Spillare E. A., Weinberg W. C., Felley-Bosco E., Wang X. W., Geller D. A., Tzeng E., Billiar T. R., Harris C. C. (1996): Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2442 – 2447.

Furchgott R. F. and Zawadzki J. V. (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373 – 376.

Gal A. and Wogan G. N. (1996): Mutagenesis associated with nitric oxide production in transgenic SJL mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15102 – 15107.



Gergel D., Misik V., Ondrias K., Cederbaum A. I. (1995): Increased cytotoxicity of 3-morpholinosydnonimine to HepG2 cells in the presence of superoxide dismutase. *J. Bio. Chem.* 270: 20922 – 20929.

Gerschenson L. E. and Rotello R. J. (1992): Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J.* 6: 2450 – 2455.

Green L. C., Wagner D. A., deLuzuriaga R. K., Istfan N., Young V. R., Tannenbaum S. R. (1981): Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7764 – 7768.

Griscavage J. M., Rogers N. E., Sherman M. P., Ignarro L. J. (1993): Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. *J. Immunol.* 151: 6329 – 6337.

Gobbel G. T., Chan T. Y., Chan P. H. (1997): Nitric oxide and superoxide mediated toxicity in cerebral endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282: 1600 – 1607.

Gorsdorf S., Appel K. E., Engeholm C., Gunter O. (1990): Nitrogen dioxide induces DNA single-strand breaks in cultured Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* 11: 37 – 41.

Gow A. J., Thom S. R., Ischiropoulos H. (1998): Nitric oxide and peroxynitrite-mediated pulmonary cell death. *Am. J. Physiol.* 274: L112 – L118.

Graziewicz M., Wink D. A., Laval F. (1996): Nitric oxide inhibits DNA ligase activity: potential mechanisms for NO-mediated DNA damage. *Carcinogenesis* 17: 2501 – 2505.

Green L. C., Skipper P. L., Turesky R. J., Bryant M. S., Tannenbaum S. R. (1984): In vivo dosimetry of 4-aminobiphenyl in rats via a cysteine adduct in hemoglobin. *Cancer Res.* 44: 4254 – 4259.

Griscavage J. M., Rogers N. E., Sherman M. P., Ignarro L. J. (1993): Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited

by nitric oxide. *J. Immunol.* 151: 6329 – 6337.

Gurr J. R., Liu F., Lynn S., Jan K. Y. (1998): Calcium – dependent nitric oxide production is involved in arsenite – induced micronuclei. *Mutat. Res.* 416: 137 – 148.

Habib A., Bernard C., Lebret M., Creminon C., Esposito B., Tedgui A., Macclouf J. (1997): Regulation of the expression of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in rat peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 158: 3845 – 3851.

Haendeler J., Weiland U., Zeiher A. M., Dimmeler S. (1997): Effects of redox-related congeners of NO on apoptosis and caspase-3 activity. *Nitric Oxide: Bio. Chem.* 1: 282 – 293.

Haijar D., Lander H. M., Prearce S. F., Upmacis R. K., Pomerantz K. B. (1995): Nitric oxide enhances prostaglandin-H synthase activity by a heme-independent mechanism: evidence implicating nitrosothiols. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 3340 – 3346.

Hajri A., Metzger E., Coffy S., Flatter E., Evrard S., Marescaux J. Aprahamian M. (1998): Role of nitric oxide in pancreatic tumour growth: in vivo and in vitro studies. *Brit. J. Cancer* 78: 841 – 849.

Hall T. J., Gasser J., Feige U., Ferrini P. G. (1994): Effects of the cytokine synthesis inhibitor CGP 47969A on nitric oxide production by lipopolysaccharide – stimulated J774A.1 macrophages. *Agents Actions* 43: 60 – 63.

Hedde J. A. (1973): A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat. Res.* 44: 63 – 69.

Hedley D. W. and McCulloch E. A. (1996): Generation of reactive oxygen intermediates after treatment of blasts of acute myeloblastic leukemia with cytosine arabinoside: role of bcl – 2. *Leukemia* 10: 1143 – 1149.

Hibbs J. B., J. r., Taintor R. R., Vavrin Z. (1987): Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and iminuo nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235: 473-476.

Hibbs J. B., Jr., Taintor R. R., Vavrin Z., Rachlin E. M. (1988): Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 87 – 94.

Hirano S. (1988): Nitric oxide-mediated cytotoxic effects of alveolar macrophages on transformed lung epithelial cells are independent of the  $\beta 2$  integrin-mediated intercellular adhesion. *Immunology* 93: 102 – 108.

Hoffman B. and Liebermann D. A. (1994): Molecular control of apoptosis: differentiation/growth arrest primary response genes, proto-oncogenes, and tumor suppressor genes as positive and negative modulators. *Oncogene* 9: 1807 – 1812.

Ho Y. S., Wang Y. J., Lin J. K. (1996): Induction of p53 and p21/WAF1/ CIP1 expression by nitric oxide and their association with apoptosis in human cancer cells. *Mol. Carcinog.* 16: 20 – 31.

Hogg N., Darley-Usmar V. M., Wilson M. T., Moncada S. (1992): Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem. J.* 281: 419 – 424.

Holian A. and Scheule R. K. (1990): Alveolar macrophage biology. *Hosp. Pract.* 15: 53 – 62.

Hortelano S., Lopez-Collazo E., Bosca L (1999): Protective effect of cyclosporin A and FK506 from nitric oxide-dependent apoptosis in activated macrophages. *Brit. J. Pharmacol.* 126: 1139 – 1146.

Huie R. E. and Padmaja (1993): The reaction of NO with superoxide. *Free Rad. Res. Commun.* 18: 195 – 199.

Ignarro L. J. (1989): Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Cir. Res.* 65: 1 – 21.

Ignarro L. J., Buga G. M., Wood K. S., Byrnes R. E., Chaudhuri G. (1987): Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and

vein is nitric oxide. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 9265 – 9269.

Ionnidis I. and Groot H. (1993): Cytotoxicity of nitric oxide in Fu5 rat hepatoma cells: evidence for co – operative action with hydrogen peroxide. Biochem. J. 296, 341 – 345.

Ischiropoulos H., Zhu L., Beckman J. S. (1992): Peroxynitrite formation from macrophages-derived in nitric oxide. Arch. Biochem. Biophys. 298: 446 – 551.

Ishii M., Shimizu S., Momose K., Yamamoto T. (1999): SIN-1 – induced cytotoxicity in cultured endothelial cells involves reactive oxygen species and nitric oxide: protective effect of sepiapterin. J. Cardiovas. Pharmacol. 33: 295 – 300.

Isomura K., Chikahira M., Teranishi K., Hamada K. (1984): Induction of mutations and chromosome aberrations in lung cells following in vivo exposure of rats to nitrogen oxides. Mutat. Res. 136: 119 – 125.

Iyengar R., Stuehr D. J., Marletta M. A. (1987): Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamine: precursor and role of the respiratory burst. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6369 – 6373.

Jun C. D., Han M. K., Kim U. H., Chung H. T. (1996): Nitric oxide induces ADP-ribosylation of actin in murine macrophages: association with the inhibition of pseudopodia formation, phagocytic activity, and adherence on a laminin substratum. Cell. Immunol. 174: 25 – 34.

Kastan M. B., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B., Craig R. W. (1991): Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res. 51: 6304 – 6311.

Kerr J. F. R., and Searle J. (1972): A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figure. J. Pathol. 107: 41 – 44.

Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R. (1972): Apoptosis: a basic biologic phenomenon with wild-ranging implications in tissue jinetices. Brit. J.

Cancer 26: 239 – 257.

Khan S., Kayahara M., Joashi U., Mazarakis N. D., Sarraf C., Edwards A. D., Hughes M. N., Mehmet H. (1997): Differential induction of apoptosis in Swiss 3T3 cells by nitric oxide and the nitrosonium cation. *J. Cell Sci.* 110: 2315 – 2322.

Koshland D. E. (1992): The molecule of the year. *Science* 258: 1861.

Kosaka H., Wtshnok J. S., Miwa M., Lead C. D., Tannenbaum S. R. (1989): Nitrosation by stimulated macrophages. Inhibitors, enhancers and substrates. *Carcinogenesis* 10: 563 – 566.

Krishna G., Urda G., Tefera W., Lalwani N. D., Theiss J. (1995): Simultaneous evaluation of dexamethasone-induced apoptosis and micronuclei in rat primary spleen cell cultures. *Mutat. Res.* 332: 1-8.

Kroncke K. D., Brenner H. H., Rodriguez M. L., Eitzkorn K., Noack E. A., Kolb-Bachofen H. (1993): Pancreatic islet cells are highly susceptible towards the cytotoxic effects of chemically generated nitric oxide. *Biochem. Biophys. Acta* 1182: 221 – 229.

Kroncke K. D., Fehsel K., Victoria K. B. (1997): Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection – how, why, when, and where? *Nitric Oxide: Bio. Chem.* 1: 107 – 120.

Lander H. M., Ogiste J. S., Pearce S. F., Levi R., Novogrodsky A. (1995): Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21 ras. *J. Biol. Chem.* 270: 7017 – 7020.

Laval J. and Wink D. A. (1994): Inhibition by nitric oxide of the repair protein. O6-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Carcinogenesis* 15: 443 – 447.

Leist M., Volbracht C., Kuhnle S., Fava E., Ferrando-May E., Nicotera P. (1997): Caspase-mediated apoptosis in neuronal excitotoxic triggered by nitric oxide. *Mol. Med.* 3: 750 – 764.

- Lin W., Xue H., Liu S., He Y., Fu J., Zhou Z. (1998): Genotoxicity of nitric oxide produced from sodium nitroprusside. *Mutat. Res.* 413: 121 – 127.
- Lipton S. A., Choi Y. B., Pan Z. H., Lei S. Z., Chen H. S. V., Sucher N. J., Loscalzo J., Singel D. J., Stamler J. A. (1993): A redox- based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: 626 – 632.
- Liu R. H., Baldwin B., Tennant, B. C., Hotchkiss J. H. (1991): Elevated formation of nitrate and N-nitrosodimethylamine in woodchuck (*Marmotamonax*) associated with chronic woodchuck hepatitis virus infection. *Cancer Res.* 51: 3925 – 3929.
- Liu R. H., Jacob J. R., Tennant B. D., Hotchkiss J. H. (1992): Nitrite and nitrosamine synthase by hepatocytes isolated from normal woodchucks (*Marmota monax*) and woodchucks chronically infected with woodchucks hepatitis virus. *Cancer Res.* 52: 4139 – 4143.
- Lynn S., Yew F. H., Hwang J. W., Tseng M. J., Jan K. Y. (1994): Glutathione can rescue the inhibitory effects of nickel on DNA ligation and repair synthesis. *Carcinogenesis* 15: 2811 – 2816.
- Marletta M. A., Yoon P. S., Iyengar R., Leaf C. D., Wishnok J. S. (1988): Macrophage oxidation of L – arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 27: 8706 – 8711.
- Marnett L. J., and Burcham P. C. (1993): Endogenous DNA adducts: potential and paradox. *Chem. Res. Toxicol.* 6: 771 – 785.
- Matter B. E., and Grauwiler J. (1974): Micronuclei in mouse bone-marrow cells. A simple in vivo model for the evaluation of drug-induced chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 23: 239 – 249.
- Marx J. (1994): New link between p53 and DNA repair. *Science* 266: 1321 – 1322.
- McCall T. and Vallance P. (1992): Nitric oxide takes centre-stage with newly defined roles. *Trends Pharmacol. Sci.* 13: 1 – 6.

McCord J. M. and Fridovich I. (1969): Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin. *J. Bio. Chem.* 244: 6049 – 6055.

Messmer U. K., Ankarcrone M., Nicotera P. Brune B. (1994): p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 355: 23 – 26.

Messmer U. K. and Brune B. (1995): Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signalling pathways. *Biochem. J.* 319: 299 – 305.

Messmer U. K., Lapetina E. G., Brune B. (1995): Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages antagonized by protein kinase C and protein kinase A activating compounds. *Mol. Pharmacol.* 47: 757 – 767.

Messmer U. K., Reimer, D. M., Reed J. C., Brune B. (1996): Nitric oxide induced poly (ADP-ribose) polymerase cleavage in RAW 264.7 macrophage apoptosis is blocked by Bcl-2. *FEBS Lett.* 384: 162 – 166.

Messmer U. K. and Brune B. (1995): Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signalling pathways. *Biochem. J.* 319: 299 – 305.

Messmer U. K. and Brune B. (1996): Nitric oxide (NO) in apoptotic versus necrotic RAW 264.7 macrophage cell death: the role of NO-donor exposure, NAD<sup>+</sup> cotent, and p53 accumulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 327: 1-10.

Messmer U. K., Reimer D. M., Brune B. (1998): Protease activation during nitric oxide-induced apoptosis: comparison between poly(ADP-ribose) polymerase and U1-70kDa cleavage. *Eur. J. Pharmacol.* 349: 333 – 343.

Miwa M., Stuhr D. J., Marletta M. A., Wishnok J. S., Tannenbaum S. R. (1987): Nitrosation of amines by stimulated macrophages. *Carcinogenesis* 8: 955 – 958.

Moellering D., Andrew J. M., Patel R. P., Forman H. J., Mulcahy R. T., Jo H., Darley-Usmar V. M. (1999): The induction of GSH synthesis by nanomolar concentrations of NO in endothelial cells: a role for  $\gamma$ -glutamylcysteine



synthetase and  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase. FEBS Lett. 448: 292 – 296.

Moncada S., Palmer R. M. J, Higgs E. A. (1988): The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. Hypertension 12: 365 – 372.

Moro M. A., Paz F. T., Leza J. C., Lorenzo P., Lizasoain I. (1998): Neuronal death induced by SIN-1 in the presence of superoxide dismutase: protection by cyclic GMP. Neuropharmacology 37: 1071 – 1079.

Mosmann T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application and cytotoxicity. J. Immunol. Methods 65: 55.

Murad F., Arnold W. P., Mittal C., Katsuki S. (1977): Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine-3', 5'-monophosphate levels in various tissue preparation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 3203 – 3207.

Murray H. W., Nathan C. F., Cohn Z. A. (1980): Macrophages oxygen-dependent antimicrobial activity. IV. Role of endogenous scavengers oxygen intermediates. J. Exp. Med. 152: 1610 – 1624.

Nakazawa M., Uehara T., Nomura Y. (1997): Koningic acid (a potent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitor)-induced fragmentation and condensation of DNA in NG108-15 cells. J. Neurochem. 68: 2493 – 2499.

Nathan C., and Cohn Z. (1980): Role of oxygen-dependent mechanisms in antibody-induced lysis of tumor cells by activated macrophages. J. Exp. Med. 152: 198 – 208.

Nathan C. F. (1987): Secretory products of macrophages. J. Clin. Invest. 79: 319 – 326.

Nathan C. F. (1982): Secretion of oxygen intermediates: role in effector functions of activated macrophages. Federation Proc. 41: 2206 – 2211.

Nathan C. F., Murray H. W., Cohn Z. A. (1980): The macrophages as an effector cell. New Eng. J. Med. 303: 622 – 626.

Nguyen T., Brunson D., Crespi C. L., Penman B. W., Wishnok J. S. Tannenbaum S. R. (1992): DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3030 – 3034.

Nicholson D. W., Ali A, Thornberry N. A. (1995): Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376: 37 – 43.

Nicotera P., Brune B., Bagetta D. (1997): Nitric oxide: inducer or suppressor of apoptosis ? *Trends Pharmacol. Sci.* 18: 189 – 190.

Niknahad H. and O'Brien (1996): Involvement of nitric oxide in nitroprusside-induced hepatocyte cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* 51: 1031 – 1039.

Nishikawa M., Sato E. F., Kuroki T., Inoue M. (1997): Role of glutathione and nitric oxide in the energy metabolism of rat liver mitochondria. *FEBS Lett.* 415: 341 – 345.

Nishio E., Fukushima K., Shiozaki M., Watanabe Y. (1996): Nitric oxide donor SNAP induces apoptosis in smooth muscle cells through cGMP-independent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 221: 163 – 168.

Ostrowski J., Stockhausen H., Kessler E., Gruber C., Schraven E., Herrmann (1992): Exogenous nitric oxide stress on endothelial cells and macrophages. *J. Cardiovas. Pharmacol.* 20 (suppl. 12): S148 – S150.

Palmer R. M. J., Ferridge A. G., Moncada S. (1987): Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524 – 526.

Paul A., Bryant C., Lawson M. F., Chilvers E. R. Plevin R. (1997): Dissociation of lipopolysaccharide – mediated induction of nitric oxide synthase and inhibition of DNA synthesis in RAW 264.7 macrophages and rat aortic smooth muscle cells. *Brit. J. Pharmacol.* 120: 1439 – 1444.

Radi R., Beckman J. S., Bush K. M., Freeman B. A. (1991): Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic

potential of superoxide and nitric oxide. Arch. Biochem. Biophys. 288: 481 – 487.

Radomski M. W., Palmer R. M. J., Moncada S. (1990): An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5193 – 5197.

Rauhala P., Khaldi A., Mohanajumar P., Chiueh C. C. (1998): Apparent role of hydroxyl radicals in oxidative brain injury induced by sodium nitroprusside. Free Radical Bio. Med. 24: 1065 – 1073.

Reed D. J. (1990): Glutathione: toxicological implications. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30: 603 – 631.

Rees D. D., Palmer R. M., Moncada S. (1989): Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3375 – 3378.

Rietschel E. T. and Brade H. (1992): Bacterial endotoxins. Sci. Am., August: 26-33.

Routledge M. N., Wink D. A., Keefer L. K., Dipple A. (1993): Mutations induced by saturated aqueous nitric oxide in the pSP189 supF gene in human Ad293 and E. coli MBM7070 cells. Carcinogenesis 14: 1251 – 1254.

Sahu K. and Das R. K. (1995): Micronucleus assay in pulmonary alveolar macrophages, a simple model to detect genotoxicity of environmental agents entering through the inhalation route. Mutat. Res. 347: 61 – 65.

Saker R., Webb R. C., Stanley J. C. (1995): Nitric oxide inhibition of endothelial cell mitogenesis and proliferation. Surgery 118: 274 – 279.

Salblina A. A., Iiyinskaya G. V., Rubtsova S. N., Agapova L. S., Chumakov P. M. (1998): Activation of p53-mediated cell cycle checkpoint in response to micronuclei formation. J. Cell Sci. 111: 977 – 984.

Salvesen G. S. and Dixit V. M. (1997): Caspases: intercellular signaling by proteolysis. Cell 91: 443 – 446.

Sandau K., Pfeilschifter J., Brune B. (1998): Nitrosative and oxidative stress induced heme oxygenase-1 accumulation in rat mesangial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 342: 77 -84.

Sano H., Hirai M., Satto H., Nakashima I., Isobe K. I. (1997): A nitric oxide - releasing reagent, S - nitroso - N - acetylpenicillamine, enhances the expression of superoxide dismutase mRNA in the murine macrophage cell line RAW 264.7. *Immunology* 92: 118 - 122.

Sarih M., Souvannavong V., Adam A. (1993): Nitric oxide synthase induces macrophages death by apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 191: 503 - 508.

Schwartz D., Almog N., Goldfinger N., Rotter V. (1997): Role of wild type p53 in the G2 phase: regulation of the  $\gamma$ -irradiation-induced delay and DNA repair. *Oncogene* 15: 2597 - 2607.

Sewerynek E., Ortiz G. G., Reiter R. J., Pablos M. I., Melchiorri D., William M. U., Daniels H. (1996): Lipopolysaccharide - induced DNA damage is greatly reduced in rats treated with the pineal hormone melatonin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 117: 183 - 188.

Singh S. P., Wishnok J. S., Keshive M., Deen W. M., Tannenbaum S. R. (1996): The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14428 - 14433.

Skladanowski A. and Konopa J. (1993): Adriamycin and daunomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumour cells. *Biochem. Pharmacol.* 46: 375 - 382.

Stamler J. S., Singel D. J., Loscalzo J. (1992): Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898 - 1902.

Stibille Y., and Reynolds H. Y. (1990): Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 471 - 501.

Stuehr D. J. and Marletta M. A. (1985): Mammalian nitrate biosynthesis:

mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to E coli LPS. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7738 - 7742.

Stuehr D. J. and Marletta M. A. (1987): Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. Cancer Res. 47: 5590 - 5594.

Stuehr D. J., and Nathan C. F. (1989): Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. J. Exp. Med. 169: 1543 - 1555.

Stuehr D. J., Gross S., Sakuma I., Levi R., Nathan C. (1989): Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. J. Exp. Med. 169: 1011 - 1020.

Sumitani K., Kamijo R., Nagumo M. (1997): Cytotoxic effect of sodium nitroprusside on cancer cells: involvement of apoptosis and suppression of c-myc and c-myb proto-oncogene expression. Anticancer Res. 17: 865 - 872.

Surrallés J., Xamena N., Creus A., Marcos R. (1995): The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair. Mutat. Res. 342: 43 - 59.

Sweet M. J. and Hume D. A. (1996): Bacterial lipopolysaccharide confers resistance to G418, doxorubicin, and taxol in the murine macrophage cell line, RAW 264. J. Leukocyte Bio. 59: 280 - 286.

Sylvie C., Pierre H., Hiroshi O. (1997): Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. Cancer Res. 57: 3365 - 3369.

Szabo C. and Salzman A. L. (1995): Endogenous peroxynitrite is involved in the inhibition of mitochondrial respiration in immuno-stimulated J774.2 macrophages. Biochem. Biophys. Res. Co. 209: 739 - 743.

Takemura H., Reiko J., Werb Z. (1984): Secretory products of macrophages and their physiological functions. Am. J. Physiol. 246: C1 - C9.

Tamatani M., Ogawa S., Niitsu Y., Tohyama M. (1998): Involvement of bcl-2 family and caspase-3-like protease in NO-mediated neuronal apoptosis. *J. Neurochem.* 71:1588 – 1596.

Tannenbaum S. R., Tamir S., deRojas-Walker T., Wishnok J. S. (1994): DNA damage and cytotoxicity by nitric oxide. In: Loeppky RN, Michejda CJ. *Nitrosamines and Related N-Nitroso Compounds* vol. 10: 120 – 135.

Troy C. M., Derossi D., Prochiantz A., Greene L. A., Shelanski M. L. (1996): Downregulation of Cu/Zn superoxide dismutase leads to cell death via the nitric oxide-peroxynitrite pathway. *J. Neurosci.* 16: 253 – 261.

Ullrich T., Oberle S., Abate A., Schroder (1997): Photoactivation of the nitric oxide donor SIN-1. *FEBS Lett.* 406: 66 – 68.

Villa P., Kaufmann S. H., Earnshaw W. C. (1997): Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem. Sci.* 22: 388 – 393.

Volk T., Ioannidis I., Hensel M., deGroot H., Kox W. J. (1995): Endothelial damage induced by nitric oxide: synergism with reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 213: 196 – 203.

Walker M. W., Kinter M. T., Roberts R. J., Spitz D. R. (1995): Nitric oxide-induced cytotoxicity: involvement of cellular resistance to oxidative stress and the role of glutathione in protection. *Pediatric Res.* 37: 41 – 49.

Wang H. and Keiser J. A. (1998): Molecular characterization of rabbit CPP32 and its function in vascular smooth muscle cell apoptosis. *Am. J. Physiol.* 274: H1132 – H1140.

Wang L., Miura M., Bergeron L., Zhu H., Yuan J. (1994): Ich - 1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* 78: 739 – 750.

Wink D. A. and Laval J. (1994): The Fpg protein, a DNA repair enzyme, is inhibited by the biomediator nitric oxide in vitro and in vivo.

Carcinogenesis 15: 2125 – 2129.

Wink D. A. and Mitchell J. B. (1998): Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Bio. Med.* 25: 434 – 456.

Wink D. A., Kasprzak K. S., Maragos C. M., Elespuru R. K., Misra M., Dunams T. M., Cebula T. A., Koch W. H., Andrews A. W., Allen J. S., Keefer L. K. (1991): DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 254: 1001 – 1003.

Wright C. D., Mulsch A., Busse R. Oswald H. (1989): Generation of nitric oxide by human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 160: 813 – 819.

Wyllie A. H. (1980): Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555 – 556.

Xia Y. and Zweier J. L. (1997): Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6954 – 6958.

Xie K., Huang S., Dong Z., Juang S. H., Gutman M., Xie Q. W., Nathan C. Fidler I. J. (1995): Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. *J. Exp. Med.* 181: 1333 – 1343.

Yabuki M., Kariya S., Inai Y., Hamazaki K., Yoshioka T., Yasuda T., Horton A. A., Utsumi K. (1997): Molecular mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by a nitric oxide-releasing compound. *Free Radical Res.* 27: 325 – 335.

Yamada M., Momose K., Richelson E., Yamada M. (1996): Sodium nitroprusside-induced apoptotic cellular death via production of hydrogen peroxide in murine neuroblastoma N1E-115 cells. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 35: 11 – 17.

Yermilov V., Rubio J., Becchi M., Friesen M. D., Pignatelli B., Ohshima H. (1995): Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with

peroxynitrite in vitro. *Carcinogenesis* 16: 2045 - 2050.

Zhang J., Dawson V. L., Dawson T. M., Snyder S. H. (1994): Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 263: 687 - 689.

Zhuang J. C. and Wogan G. N. (1997): Growth and viability of macrophages continuously stimulated to produce nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11875 - 11880.

Zingarelli B., O'Connor M., Wong H., Salzman A. D., Szabo C. (1996): Peroxynitrite - mediated DNA strand breakage activates poly-adenosine diphosphate ribosyl synthetase and causes cellular energy depletion in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 156: 350 - 358.



## 口試問答紀錄

1. NDI 的計算公式為何將 3 核和 4 核合併在一起？  
主要以 3 核較多而 4 核較少，故可將之合併。
2. 圖 6. 細胞存活率 LPS 為何只作用 2 小時？  
為配合作微小核的研究條件，以求前後條件統一。
3. MTT assay 作存活率，若細胞生長被阻斷，但沒有死，判斷上會高估其殺傷力？  
細胞生長被阻斷，succinate dehydrogenase 有可能活性被下降，可能有此缺點，故需搭配其他研究方法加以對照。
4. SNP 是 NO 產生最差的藥物，為何作 LLC 的細胞毒性研究用此藥物？  
除了因為此藥物較多之外，亦有學者作過類似的研究，故以此藥物作研究。
5. 為何用此四種 NO donors？有何特性？  
由於此四種 NO donors 皆會釋放 NO，但結構式皆不同，SNAP 和 GSNO 皆含 S-NO 基團。另外，SNP 在光線存在下才能釋放 NO。既然此四種 NO donors 之物性，化性有所差異，所以吾人選用此四種 NO donors 探討其在細胞-遺傳毒性之差異性。
6. LPS 約多久可生成 nitrite？  
約 4-6 小時即可產生。
7. Table 2 中，產生微小核(遺傳毒性)是在較低濃度，在圖 3 中，反而是較高濃度產生，為什麼？  
本實驗室一向有此結果，微小核通常在低濃度即可產生，高濃度才有細胞毒性的產生。
8. 縮寫表內的藥物分類可省略，論文內的大小寫應統一，簡寫部分若是第一次出現，應先寫全名，第二次出現再寫簡寫。
9. p. 20-21，第四行 55k 的 k 代表什麼？  
分子量，應更正為 KDa。
10. 實驗中作了幾次實驗應寫出。